

Université de Sherbrooke

**Dysfonctions mitochondriales et dimorphismes sexuels dans un modèle
murin à double atteinte de schizophrénie lors d'un traitement au
1-méthyl-DL-tryptophane**

Par
Olivier Hubert
Département de Pharmacologie-Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en Physiologie

Sherbrooke, Québec, Canada
Novembre, 2019

Membres du jury d'évaluation

Sylvain Grignon MD PhD	Programme de Physiologie ; Directeur de recherche
Philippe Sarret PhD	Programme de Physiologie ; Co-Directeur de recherche
Denis Gris PhD	Programme de Physiologie ; Membre interne au programme
Xavier Roucou PhD	Programme de Biochimie ; Membre externe au programme

Épigraphe

*Rien ne se perd,
Rien ne se crée :
Tout se transforme*

Antoine Laurent de Lavoisier

Résumé

Dysfonctions mitochondriales et dimorphismes sexuels dans un modèle murin à double atteinte de schizophrénie lors d'un traitement au 1-méthyl-DL-tryptophane

Par
Olivier Hubert
Programme de Physiologie

Mémoire présenté à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de maître ès sciences (M.Sc.) en physiologie, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Mots clés : Schizophrénie, glutamate, production d'ATP, respiration, dimorphisme sexuel, protéines découplantes, complexes OXPHOS, mitochondrie

La schizophrénie est une maladie mentale chronique et sévère caractérisée par des symptômes positifs, cognitifs et négatifs. La maladie va présenter de nombreuses dérégulations parmi lesquelles une dérégulation de la production d'espèce réactive d'oxygène. Le laboratoire a développé un modèle murin à double atteinte de schizophrénie reposant sur une inflammation gestationnelle (activation immunitaire causée par l'injection de l'acide polyinosinique : polycytidylique) favorisant la production d'espèces réactives d'oxygène lors d'un stress de contention répété à l'âge juvénile (jours postnataux 33-35) pour mieux explorer la phase précoce du développement de la schizophrénie. Une étude antérieure du laboratoire a montré des dérégulations mitochondriales chez ces souris, plus précisément une hyperactivité des complexes I et II dans le striatum des souris mâles, prévenue par un traitement avec l'acide lipoïque, un antioxydant. Cette étude tentera de déterminer indirectement si le déséquilibre du neurotransmetteur glutamate serait la cause des dérégulations mitochondriales observées précédemment. Le 1-méthyl-DL-tryptophane (1-MT) est utilisé, car l'acide kynurénique (KYNA) est un antagoniste des récepteurs N-méthyl-D-aspartate et de plus, il semble être surproduit dans les astrocytes dans la schizophrénie. Selon cette hypothèse, le 1-MT un inhibiteur de l'enzyme indoleamine 2-3, dioxygénase permettrait de restaurer les fonctions mitochondriales en inhibant la production de KYNA et donc en normalisant la fonction des récepteurs NMDA. Il a été observé dans ce projet de nombreux dimorphismes sexuels entre les souris contrôles et les souris du modèle. En effet, les souris femelles contrôles présentent une différence de l'activité respiratoire et de la production d'ATP dans la co-activation des complexes I et II. Le traitement au 1-MT ne présente aucun effet sur la respiration et diminue la production d'ATP. Le 1-MT cause une surexpression protéique de certaines sous-unités des complexes OXPHOS et de protéines associées exclusivement dans le cortex préfrontal. D'autres expériences sont nécessaires pour comprendre ces différences sexuelles.

Table des matières

Épigraphe	ii
Résumé.....	iii
Table des matières	iv
Liste des figures.....	vii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des abréviations	ix
1. Introduction.....	12
1.1 La Schizophrénie.....	12
1.1.1 Symptomatologie clinique et diagnostic de la schizophrénie	12
1.1.2 Prise en charge et évolution de la schizophrénie.....	13
1.2 Composante neurochimique.....	15
1.2.1 Voies dopaminergiques.....	15
1.2.1.1 Voie de synthèse en condition homéostatique	15
1.2.1.2 Dérégulation de la voie et conséquences	19
1.2.1.3 Hypothèse dopaminergique.....	20
1.2.2 Voie glutamatergique.....	21
1.2.2.1 Voie de synthèse en condition homéostatique	21
1.2.2.2 Dérégulation de la signalisation glutamatergique	22
1.2.2.3 Hypothèse glutamatergique.....	23
1.3 Stress oxydatif	24
1.3.1 Statut et molécules pro-oxydantes	25
1.3.2 Statut et molécules anti-oxydantes.....	26
1.3.3 Stress oxydatif et schizophrénie.....	27
1.4 Mitochondrie	28
1.4.1 Définition et rôle	28
1.4.1.1 Complexes OXPHOS (phosphorylation oxydative)	28
1.4.1.2 Protéines découplantes.....	36
1.4.1.3 Pathologies associées à des dysfonctions mitochondriales	37
1.4.2 Dysfonctions mitochondriales dans la schizophrénie	38

1.4.2.1	Anomalie bioénergétique	38
1.4.2.2	Effet de la dopamine sur les fonctions mitochondriales	39
1.4.2.3	Effet du glutamate sur les fonctions mitochondriales	39
1.4.2.4	Effet du stress oxydatif	40
1.4.2.5	Effets des traitements antipsychotiques sur les fonctions mitochondriales	40
1.5	Modèle à double atteinte.....	41
1.6	Traitement	42
1.6.1	Acide lipoïque	42
1.6.2	1-méthyl-DL-tryptophane	44
1.7	Hypothèse – Problématique	46
2.	Matériel et méthodes	48
2.1	Animaux.....	48
2.2	Modèle à double atteinte.....	48
2.3	Préparation tissulaire et extraction mitochondriale	49
2.4	Mesure de la respiration mitochondriale.....	50
2.5	Analyse de la respiration mitochondriale	51
2.6	Mesure de la production d'ATP	54
2.7	Analyse de la production d'ATP.....	55
2.8	Western Blot	57
2.9	Analyses statistiques	59
3.	Résultats.....	61
3.1	Activité mitochondriale et dimorphisme sexuel	61
3.1.1	Complexe I.....	61
3.1.2	Complexe II.....	65
3.1.3	Co-activation des complexes I et II.....	69
3.1.4	Activité de fuite.....	73
3.2	Dérégulation de l'expression protéique des complexes OXPHOS et des protéines découplantes (<i>Uncoupling protein</i>) 2 et 4	76
4.	Discussion	78
4.1	Dynamique mitochondriale.....	81
4.1.1	Dynamique intramitochondriale.....	81
4.1.1.1	Respirasome	81
4.1.1.2	Complexes OXPHOS de réserves	82

4.1.1.3	Effet des ROS.....	82
4.1.1.4	Lien entre la dynamique intramitochondriale et les résultats du projet	83
4.1.2	Dynamique extra-mitochondriale.....	84
4.1.2.1	Réticulum endoplasmique et calcium	84
4.1.2.2	Flux de calcium entre réticulum endoplasmique et mitochondrie	85
4.1.2.3	Lien entre la dynamique extra-mitochondriale et les résultats du projet	85
4.2	Modulateur externe.....	86
4.2.1	Dopamine	86
4.2.2	Œstrogène et testostérone.....	86
4.3	Dimorphismes sexuels clinique dans la schizophrénie.....	87
4.4	Résumé	88
4.5	Perspectives	89
5.	Remerciements	92
6.	Liste des références	94

Liste des figures

Figure 1 : Voie de synthèse de la dopamine	16
Figure 2 : Voie de l'activité de la dopamine en cas « normale ».....	18
Figure 3 : Voie de l'activité de la dopamine en cas de dérégulation	19
Figure 4 : Communication glutamatergique neuronale tripartite	21
Figure 5 : Dérégulation de la neurotransmission du glutamate lors d'une dysfonction des récepteurs NMDA.....	22
Figure 6 : Pro-oxydant et antioxydants intramitochondriaux	24
Figure 7 : Détoxification des espèces réactives d'oxygène produites par la chaîne respiratoire de la mitochondrie	27
Figure 8 : Structure de l'ATP synthase.....	31
Figure 9 : Fonctionnement des sous-unités β	32
Figure 10 : Cycle de Krebs	34
Figure 11 : Répartition des complexes OXPHOS au sein de la membrane interne de la mitochondrie.....	36
Figure 12 : Regroupement des différentes dérégulations mitochondriales retrouvées dans la schizophrénie et les troubles bipolaires	38
Figure 13 : Réaction de la transformation de l' α -cétoglutarate en Succinyl-CoA	43
Figure 14 : Dérégulation de la voie d'acide kynurénique dans la schizophrénie.	45
Figure 15 : Axe temporel du modèle et du contrôle.	49
Figure 16 : Résultats bruts de la respiration mitochondriale.	52
Figure 17 : Conversion de la fluorescence en consommation d'O ₂	53
Figure 18 : Résultats bruts de la production d'ATP	55
Figure 19 : Résultats de 49 gammes étalons.....	56
Figure 20 : Conversion de la luminescence en production d'ATP.....	57
Figure 21 : Buvarpage de type Western Stripping des complexes OXPHOS	59
Figure 22 : Résultats d'activité mitochondriale induite du complexe I	61
Figure 23 : Dimorphisme sexuel de l'activité respiratoire induite du complexe I	63
Figure 24 : Résultats d'activité mitochondriale induite du complexe II	65
Figure 25 : Dimorphisme sexuel de l'activité respiratoire induite du complexe II.	67
Figure 26 : Résultats d'activité mitochondriale induite des complexes I et II	69
Figure 27 : Dimorphisme sexuel de l'activité respiratoire induite de la co-activation des complexes I et II	71
Figure 28 : Résultats d'activité mitochondriale induite de l'activité de fuite	73
Figure 29 : Dimorphisme sexuel de l'activité respiratoire induite de l'activité de fuite	74
Figure 30 : Résultats de buvarpage de type Western.....	76
Figure 31 : Balance activateur inhibiteur de l'activité mitochondriale.	89
Figure 32 : Droite dose activité mitochondriale	90

Liste des tableaux

Tableau 1 : Tableau de quelques antipsychotiques.....	15
Tableau 2 : Bilan énergétique de la respiration aérobie.	35
Tableau 3 : Répartition des conditions en fonction des traitements	59
Tableau 4 : Tableau récapitulatif des effets observés dans le projet..	78

Liste des abréviations

1-MT	1-méthyl-DL-tryptophane
5-HT	5-hydroxytryptamine/sérotonine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
ADP	Adénosine diphosphate
AL	Acide lipoïque
AMPA	Acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionique
AOA	Acide oxaloacétique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
DA	Dopamine
DA-Q	Dopamine-o-quinone
DAT	<i>(dopamine transporter)</i>
DRD1	Récepteur de la dopamine de type 1
DRD2	Récepteur de la dopamine de type 2
DRP1	<i>(Dynamin-related protein 1)</i>
DSM-V	<i>(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders)</i>
EAAT	<i>(Excitatory amino acid transporter)</i>
ETC	Chaîne de transport d'électrons ou chaîne respiratoire <i>(electron transport chain)</i>
FAD ⁺	Flavine adénine dinucléotide oxydée
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide réduite
G	Jour de gestation
GABA	Acide γ -aminobutyrique
GAD67	Glutamate décarboxylase de forme 67 kDa
GDH	Glutamate déhydrogénase
Gln	Glutamine

Glu	Glutamate
GPx	Glutathion peroxydase
GSH	Glutathion réduit
GSSG	Glutathion oxydé
H ₂ O	Eau
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H ₂ O _{dd}	Eau di distillé
IDO	indoleamine 2,3-dioxygénase
IP	Intra péritonéal
KYNA	Acide kynurénique
L-DOPA	Dihydroxyphénylalanine
LPS	Lipopolysaccharides
MAO	Monoamine-oxydase
MCU	<i>(Mitochondrial calcium uniporter)</i>
MFF	<i>(Mitochondrial fission factor)</i>
mGluR	Récepteur métabotropique au glutamate
NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NM	Neuro-mélanine
NMDA	N-méthyl-D-aspartate
NMDAr	récepteur au NMDA
O ₂	Dioxygène
O ₂ ^{•-}	Anion superoxyde
OCR	<i>(oxygen consumption rate)</i>
OH [•]	Radical Hydroxyle
ONOO	Péroxynitrite
OXPHOS	Phosphorylation oxydative (<i>Oxidative phosphorylation</i>)
PANSS	<i>(Positive and Negative Syndrome Scale)</i>

PCP	Phencyclidine
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PEP	Phospho-énol pyruvate
PFC	Cortex préfrontal (<i>Prefrontal cortex</i>)
Pi	Phosphate inorganique
PIC	Acide polyinosinique:polycytidylique
PN	Jour postnatal
QA	Acide quinolinique
ROS	Espèce réactive d'oxygène (<i>Reactive oxygen species</i>)
RONS	Espèce réactive d'oxygène azoté
SC	Stress de contention
SDH	Succinate déshydrogénase ou complexe II
SOD	Superoxyde dismutase
Sp1	(<i>Specific protein 1</i>)
TCA	Cycle des acides tricarboxyliques (<i>tricarboxylic acid cycle</i>)
THMs	Modèle à double atteinte de schizophrénie (<i>two-hit model of schizophrenia</i>)
TLR-3	(<i>Toll-Like Receptor-3</i>)
TNF- α	(<i>Tumor necrosis factor-α</i>)
Trx2	Thiorédoxine réductase 2
UCP	Protéine découplante (<i>Uncoupling protein</i>)
VDAC1	(<i>Voltage-dependent anion-selective channel protein 1</i>)
VMAT2	(<i>Vesicular monoamine transport</i>)

1. Introduction

1.1 La Schizophrénie

La schizophrénie est une maladie mentale sévère et chronique affectant environ 1 % de la population mondiale, associée à différents facteurs génétiques et environnementaux. L'apparition des symptômes survient entre 20 et 25 ans, c'est-à-dire vers le début de l'âge adulte. Les patients présentent une perte de contact avec la réalité, des troubles d'attentions, un retrait social, etc.

1.1.1 Symptomatologie clinique et diagnostic de la schizophrénie

La schizophrénie est en général caractérisée par trois types de symptômes que sont les symptômes cognitifs, négatifs et positifs. Les symptômes cognitifs représentent les troubles de l'attention, de la mémoire et un déficit dans les processus de raisonnement (Van Os et al., 2010). Les symptômes négatifs sont appelés ainsi en raison du retrait ou d'une perte de fonction telle qu'une perte d'énergie ou d'un isolement social. Les symptômes positifs en revanche, vont accroître l'importance de certaines fonctions ou comportements, tels que des hallucinations visuelles et auditives (Crow, 1980).

Le diagnostic de la schizophrénie par le clinicien s'établit lors de la présence d'au moins deux symptômes persistant sur une période d'un mois. Le clinicien peut s'aider du DSM-V (de l'anglais *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*) pour poser le diagnostic et de diverses échelles psychométriques telle la PANSS (de l'anglais *Positive and Negative Syndrome Scale*) pour vérifier l'efficacité d'un traitement et au besoin, ajuster la posologie utilisée (Kay et al., 1987). Les traitements disponibles actuellement interagissent avec la transmission

dopaminergique (cf 1.1.2 prise en charge et évolution de la schizophrénie) et permettent notamment de réduire les symptômes positifs tels que les psychoses.

1.1.2 Prise en charge et évolution de la schizophrénie

L'évolution de la maladie reposerait sur 4 phases que sont la phase prémorbide, prodromale, progressive et résiduelle. La phase prémorbide correspondrait à la phase d'induction de la maladie de la vie *in utero* à la préadolescence, pendant laquelle des facteurs environnementaux et développementaux formeront les prémices de la maladie, tel que proposé dans l'hypothèse neurodéveloppementale. À la phase prodromale, les symptômes commenceraient à devenir apparents chez l'individu, bien que non spécifiques, car les patients sont en plein dans la phase de changement de l'adolescence. La phase progressive correspondrait quant à elle à l'évolution de la maladie et des symptômes associés. Enfin, la phase résiduelle, où le patient est sous traitement chronique. Une hypothèse existe durant la phase résiduelle, correspondant à une accentuation de la neurodégénérescence durant cette phase (Lieberman et al., 2001).

Pour traiter les patients atteints de la schizophrénie, divers traitements ont été développés. La chlorpromazine a été le premier antipsychotique de première génération ou dit typique qui fut découvert (Tableau 1). La Chlorpromazine fut découverte en 1950, utilisée pour ces effets sédatifs dans un premier temps, puis au milieu des années 70, pour ses propriétés à diminuer les psychoses (les symptômes positifs) des patients schizophrènes par sa liaison aux récepteurs dopaminergiques de type 2 (DRD2) (Celanire et Poli, 2015) (Endoh et al., 1973). En contrepartie, ces traitements de première génération provoqueront des effets extrapyramidaux secondaires tels qu'une akinésie, une dystonie et des symptômes retrouvés dans la maladie de Parkinson.

En plus d'inhiber les récepteurs DRD2, les traitements de deuxième génération dits atypiques, antagonisent également les récepteurs sérotoninergiques de type 2A (5-HT_{2A}), dont la résultante sera la libération de dopamine dans certaines régions du système nerveux central. Il y a donc avec cette deuxième génération une volonté de réduire les effets extrapyramidaux indésirables de la première génération d'antipsychotiques (Uçok et Gaebel, 2008).

Enfin, la troisième génération d'antipsychotiques utilise quant à elle une approche d'activation partielle des récepteurs DRD2 ajoutée à l'antagonisme des récepteurs sérotoninergiques, ce qui aura pour conséquences une stabilisation dopaminergique dans le cerveau (Burris et al., 2002).

Génération Type	Nom	Effet clinique	Effet pharmacologique		Effets secondaires
			Cible	Puissance	
Première génération Typique	Chlorpromazine	↑ Négatifs ↓ Positifs	DRD2	+	Hypotension artérielle, prise de poids, somnolence
	Fluphénazide		DRD2	+++	
Deuxième génération Atypique	Quétiapine	↓ Négatifs ↓ Positifs ↓ Cognitifs	DRD2 5-HT _{2A} H1	+ ++ +++	Prise de poids, sédation, hypotension
	Olanzapine		DRD2 5-HT _{2A} H1	++ +++ +++	
Troisième génération	Aripipazole	↓ Négatifs ↓ Positifs	DRD2 5-HT _{2A} 5-HT _{1A}	+++ +++ ++	Nausée, vertige et symptôme extrapyramid aux

Tableau 1 : Principaux antipsychotiques et leurs effets cliniques, leurs cibles et leurs effets secondaires. DRD2 : Récepteur dopaminergique de type 2 ; 5-HT_{2A} : Récepteur sérotoninergique de type 2A ; H1 : Récepteur histaminique de type 1. ↓ Diminution ; ↑ Augmentation ; Modulation : + Faible ; ++ Modéré ; +++ Important. + (noir) Antagoniste + (bleu) Agoniste (Ebert et al., 2000) (Slifstein et al., 2015) (Stahl, 2014).

1.2 Composante neurochimique

1.2.1 Voies dopaminergiques

1.2.1.1 Voie de synthèse en condition homéostatique

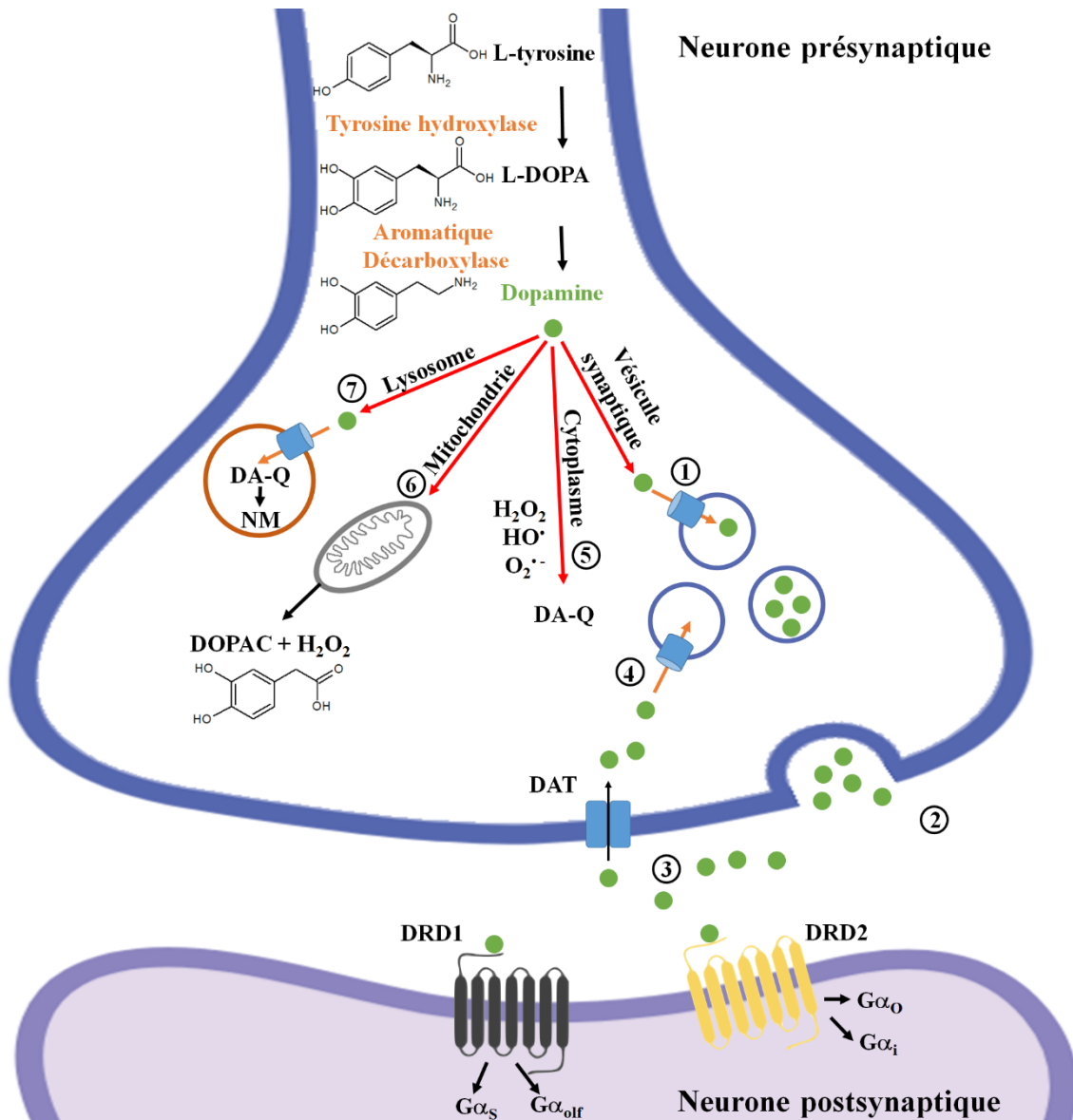


Figure 1 : Voie de synthèse de la dopamine. L-DOPA dihydroxyphénylalanine ; DA-Q dopamine-o-quinone ; $O_2^{\bullet -}$ anion superoxyde ; H_2O_2 peroxyde d'hydrogène ; OH^{\bullet} radical hydroxyle ; DOPAC acide dihydroxyphénylacétique ; NM neuromélanine ; DRD1 Récepteur dopaminergique couplé aux protéines G de type 1 activant la $G\alpha_s$ et $G\alpha_{olf}$; DRD2 Récepteur dopaminergique couplé aux protéines G de type 2 activant la $G\alpha_i$ et $G\alpha_o$; 1 VMAT2 de l'anglais *vesicular monoamine transport* ; 2 relâche du neurotransmetteur ; 3 Transport de la dopamine par les DAT de l'anglais *dopamine transporter* ; 4 Stockage par les VMAT2 ; 5 Oxydation métabolique entre les espèces réactives d'oxygène et la dopamine ; 6 Conversion de la dopamine en DA-Q par la MAO monoamine-oxydase de la mitochondrie ; 7 Internalisation de la dopamine par les VMAT2 dans les lysosomes menant à la formation de NM (Figure modifiée d'après (Sulzer et Zecca, 2009)).

La dopamine est un neurotransmetteur synthétisé à partir de l'acide aminé tyrosine. La tyrosine est transformée en dihydroxophénylalanine (L-DOPA) par la tyrosine hydroxylase, puis transformée en dopamine par l'aromatase des acides aminés aromatiques (DDC). Le devenir de la dopamine passera ensuite par différentes voies possibles (se référer à la figure 1) :

(1) Elle pourra être stockée dans les vésicules synaptiques (1) via le transporteur vésiculaire des monoamines (VMAT2 de l'anglais *vesicular monoamine transport*) pour ensuite être utilisée pour la neurotransmission (2) puis recaptée par les DAT (de l'anglais *dopamine transporter*) (3). Pour la neurotransmission, la dopamine lie ces récepteurs DRD de type 1 ou 2. La classe de DRD1 regroupe les D1 A, B, C et D menant à l'activation des protéines $G\alpha_s$ ou $G\alpha_{olf}$ alors que la classe des DRD2 regroupe les sous types D2, D3 et D4 menant à l'activation des protéines $G\alpha_i$ ou $G\alpha_o$.

(2) La dopamine pourra subir en présence d'espèces réactives d'oxygène une auto-oxydation métabolique dans le cytoplasme de la cellule neuronale et devenir de la DA-o-quinone (DA-Q) (5) lorsque le pH est élevé puis, la DA-Q subira une cyclisation et deviendra de la leucoaminochrome lorsque le pH est faible. La leucoaminochrome et la DA-Q réagiront ensemble pour donner de la dopamine et de l'aminochrome.

(3) La dopamine pourra être acheminée vers la mitochondrie où elle sera transformée en DOPAC (de l'anglais *dihydroxyphenylacetic acid*) par la MAO (de l'anglais *monoamine-oxydase*) (6) présente sur la membrane externe de la mitochondrie (Sulzer et Zecca, 2009).

(4) La dopamine pourra être transportée par les VMAT2 dans les lysosomes où elle sera séquestrée (7), puis convertie en DA-Q et ensuite en NM (neuro-mélanine).

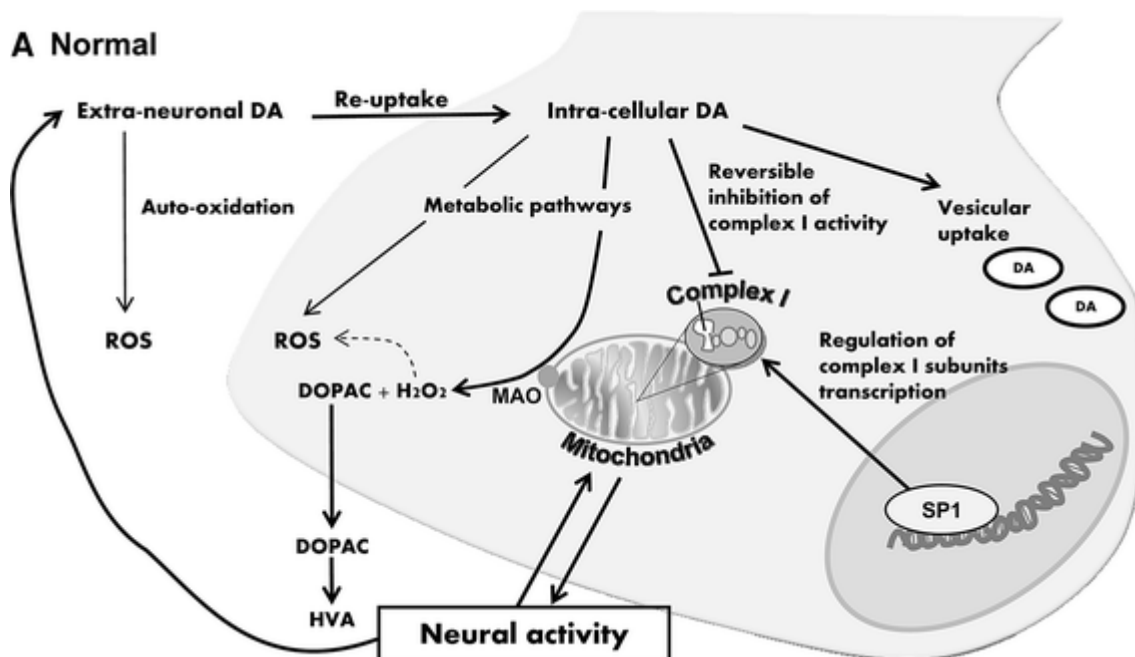


Figure 2 : Voie de l'activité de la dopamine en cas « normale ». DA dopamine ; SP1 de l'anglais *Specific protein 1* ; ROS espèces réactives d'oxygène ; MAO monoamine-oxydase ; DOPAC acide dihydroxyphénylacétique ; H₂O₂ peroxyde d'hydrogène (Figure issue de (Ben-Shachar, 2009).

En situation normale, la dopamine est relâchée pour activer les neurones postsynaptiques, elle peut être transformée par auto-oxydation dans la fente synaptique ou être recaptée par les transporteurs à la dopamine DAT des neurones dopaminergiques. Dans le neurone, la dopamine participe à la formation d'espèces réactives d'oxygène ROS (de l'anglais *reactive oxygen species*). De plus, la dopamine aura un rôle inhibiteur de l'activité du complexe I (NADH déshydrogénase cf 1.4.1.1 Chaîne respiratoire), dont la transcription dépend du facteur nucléaire SP1 (de l'anglais *Specific protein 1*) (Figure 2). Le complexe I est l'un des cinq complexes responsables de la phosphorylation oxydative (complexes OXPHOS) permettant la respiration et la production d'ATP (Adénosine triphosphate) au sein de la mitochondrie.

Les neurones dopaminergiques présentent deux types d'activité à différencier, que sont l'activité phasique et l'activité tonique. L'activité tonique correspondant à une relâche continue et n'ayant pas besoin de signal excitateur axonal pour être initiée. La seconde activité correspond à

une réponse à la suite d'un stimulus (influx nerveux) et présente la caractéristique d'augmenter fortement la concentration dopaminergique dans la fente synaptique.

1.2.1.2 Dérégulation de la voie et conséquences

B Pathological

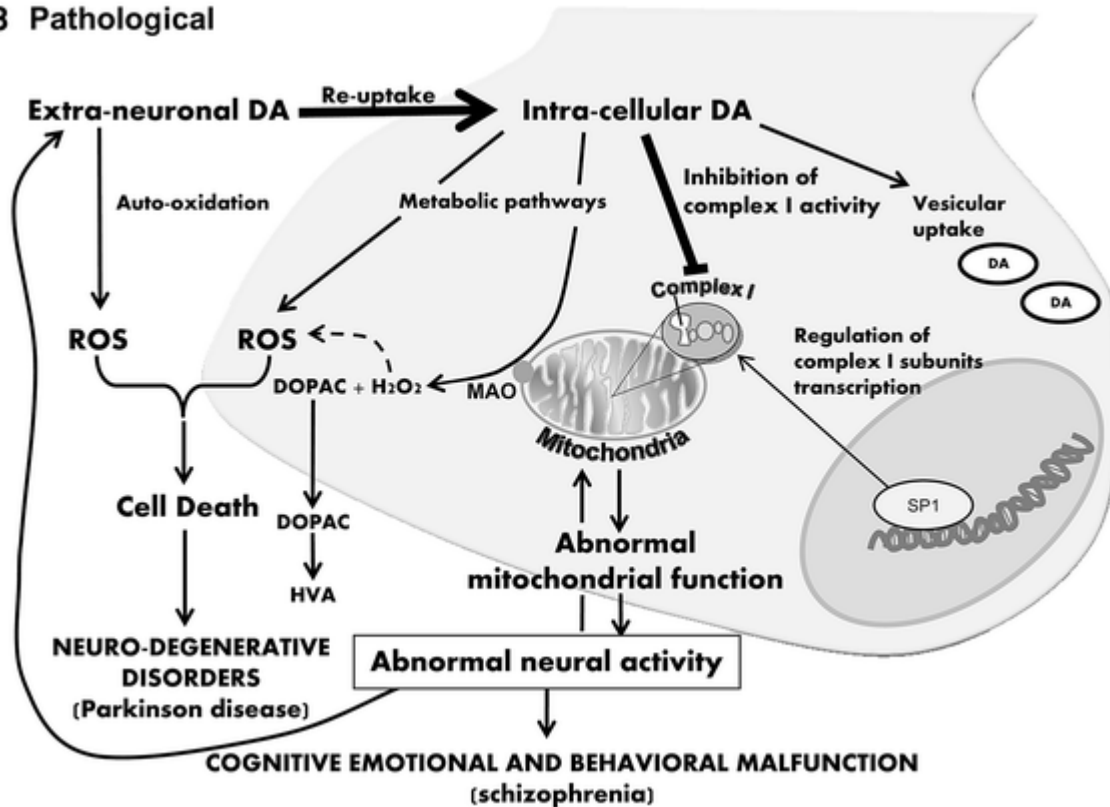


Figure 3 : Voie de l'activité de la dopamine en cas de dérégulation. DA dopamine ; SP1 de l'anglais *Specific protein 1* ; ROS espèces réactives d'oxygène ; MAO monoamine-oxydase ; DOPAC acide dihydroxyphénylacétique ; H₂O₂ peroxyde d'hydrogène (Figure issue de (Ben-Shachar, 2009)).

Dans la schizophrénie, l'hypothèse dopaminergique repose sur la dérégulation des voies mésocorticale et mésolimbique.

La voie mésolimbique, reliant l'aire tegmentale ventrale du mésencéphale aux régions du système limbique, serait soumise à une suractivation et donc à une augmentation de la relâche de dopamine, tel que le mime l'amphétamine en augmentant la libération de dopamine

(Robinson et Becker, 1986). Cette hyperactivité mènerait à l'apparition des symptômes positifs (Stahl, 2014). Comme représenté dans la Figure 3, la suractivation de la voie mésolimbique augmente le processus d'auto-oxydation de la dopamine dans la fente synaptique et ainsi favoriser le stress oxydatif dans le cerveau. De plus, le processus de transport actif de la dopamine vers le neurone présynaptique est également augmenté du fait de la présence plus abondante de la dopamine au niveau de la synapse. Cependant, les DATs (transporteur de la dopamine de l'anglais *dopamine transporter*) ne sont pas surexprimés. L'augmentation de ce transport provoque une augmentation de la concentration de la dopamine dans le neurone présynaptique. Ceci aura pour conséquence d'augmenter le stress oxydatif intraneuronal d'une part, et d'autre part, d'inhiber partiellement l'activité du complexe I de la mitochondrie (Figure 3) (Ben-Shachar, 2009).

La voie mésocorticale, reliant l'aire tegmentale ventrale du mésencéphale au cortex frontal et ventral, va quant à elle présenter une hypofonction associée à la diminution de la relâche de la dopamine d'une part vers le cortex préfrontal ventromédian associée aux symptômes négatifs, et d'autre part, vers le cortex préfrontal dorsolatéral contribuant aux symptômes cognitifs (Slifstein et al., 2015).

1.2.1.3 Hypothèse dopaminergique

Il apparaît donc que la schizophrénie reposerait sur la dérégulation des voies dopaminergiques de par la suractivation de la voie mésolimbique et une diminution des voies mésocorticales. Cependant, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer tous les symptômes cliniques, d'où le fait qu'elle soit associée à l'hypothèse glutamatergique (cf 1.2.2.3 Hypothèse glutamatergique) qui permet de combler les lacunes apparentes de l'hypothèse dopaminergique.

1.2.2 Voie glutamatergique

1.2.2.1 Voie de synthèse en condition homéostatique

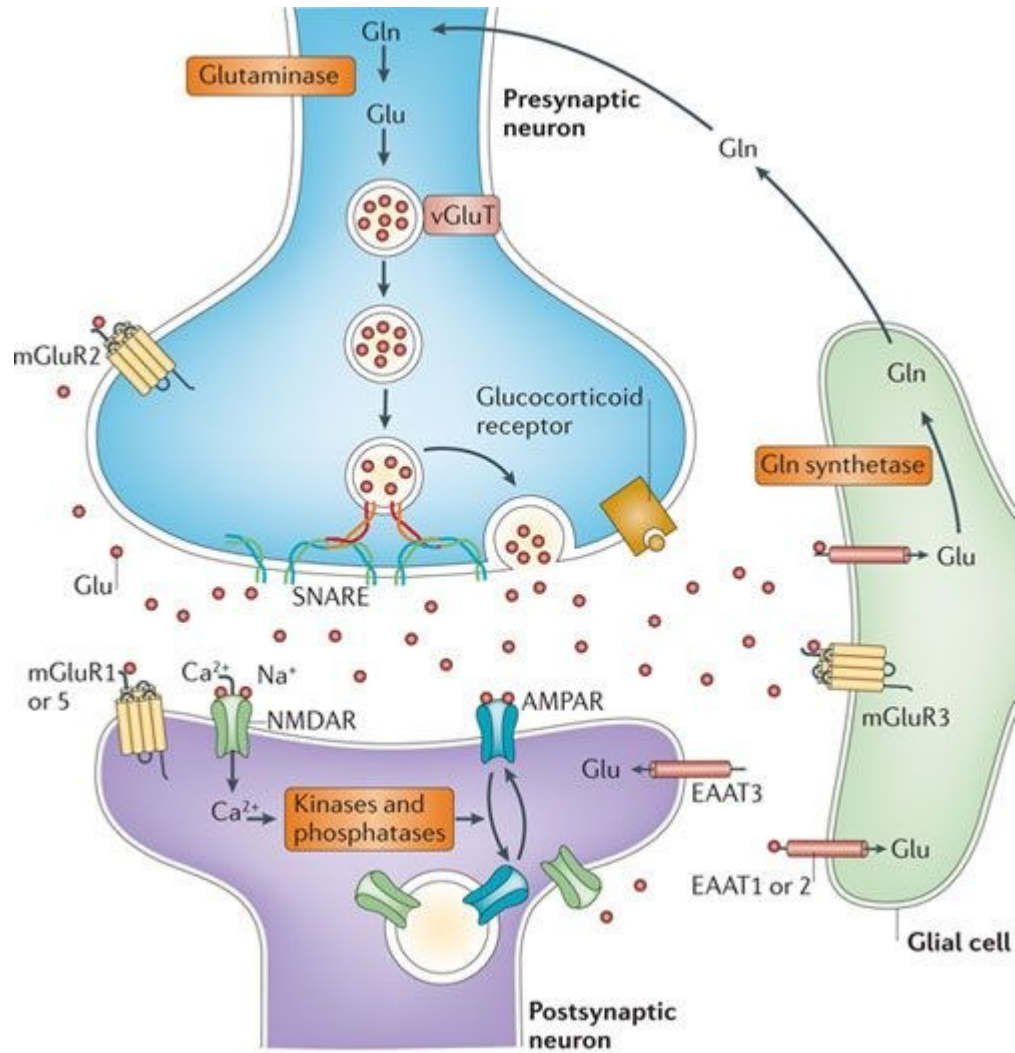


Figure 4 : Communication glutamatergique neuronale tripartite. Gln glutamine ; Glu glutamate (cercle rouge dans le vGluT et dans la fente synaptique) ; vGluT vésicule glutamatergique ; mGluR1, 2, 3 ou 5 récepteurs métabotropiques ; AMPAR (Récepteur d'acide alpha-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionique) et NMDAR récepteur ionotrope N-méthyl-D-aspartate ; EAAT 1, 2 ou 3 de l'anglais *Excitatory amino acid transporter* (Figure issue de (Popoli et al., 2012)).

Le glutamate est un neurotransmetteur synthétisé à partir de la glutamine par la glutaminase. Le glutamate formé est stocké dans des vésicules synaptiques du neurone et sera relâché dans la fente synaptique. Le glutamate lie les récepteurs du neurone postsynaptique. Ces récepteurs

postsynaptiques sont des récepteurs ionotropiques AMPARs et NMDARs (récepteur N-méthyl-D-aspartate), mais également des récepteurs métabotropiques que sont les récepteurs mGluR1 ou 5 et mGluR3 sur les cellules gliales (Figure 4). Le glutamate peut être recapté, majoritairement par les récepteurs EAAT (de l'anglais *Excitatory amino acid transporter*) 1 et 2 des cellules gliales, où il sera retransformé en glutamine par la glutaminase synthétase (Figure 4). La glutamine sera ensuite relayée au neurone présynaptique (Popoli et al., 2012). Il existe 5 voies glutamatergiques que sont la voie (1) projetant des neurones pyramidaux vers le centre des neurotransmetteurs du tronc cérébral ; (2) la voie glutamatergique corticale faisant le lien avec les neurones pyramidaux corticaux ; (3) la voie corticothalamique ; (4) la voie corticostriatale descendante et enfin (5) la voie thalamocorticale (Schwartz et al., 2012).

1.2.2.2 Dérégulation de la signalisation glutamatergique

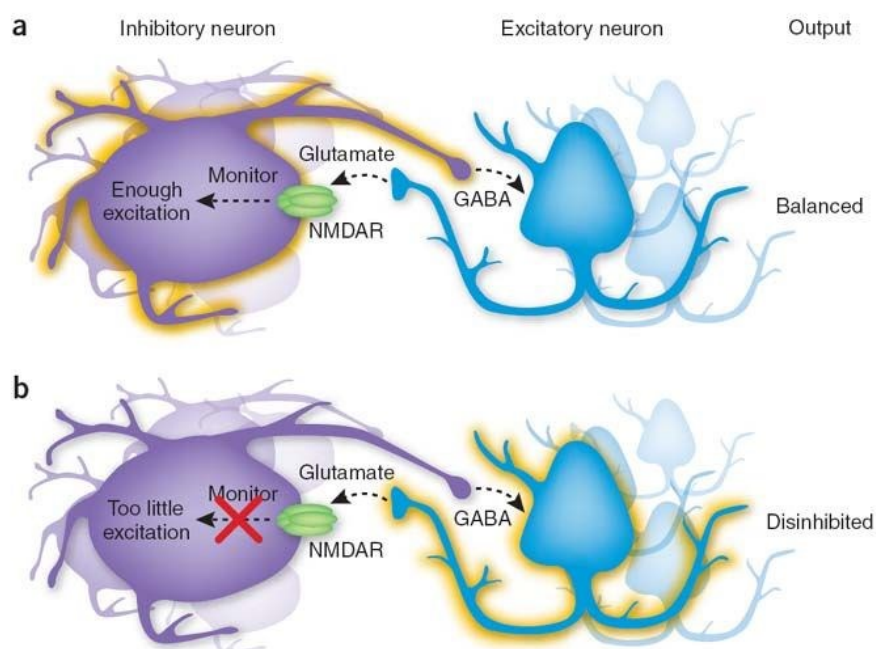


Figure 5 : Dérégulation de la neurotransmission du glutamate lors d'une dysfonction des récepteurs NMDA (NMDAR). a, cas physiologique ; b, cas pathologique. (Figure issue de (Gordon, 2010)).

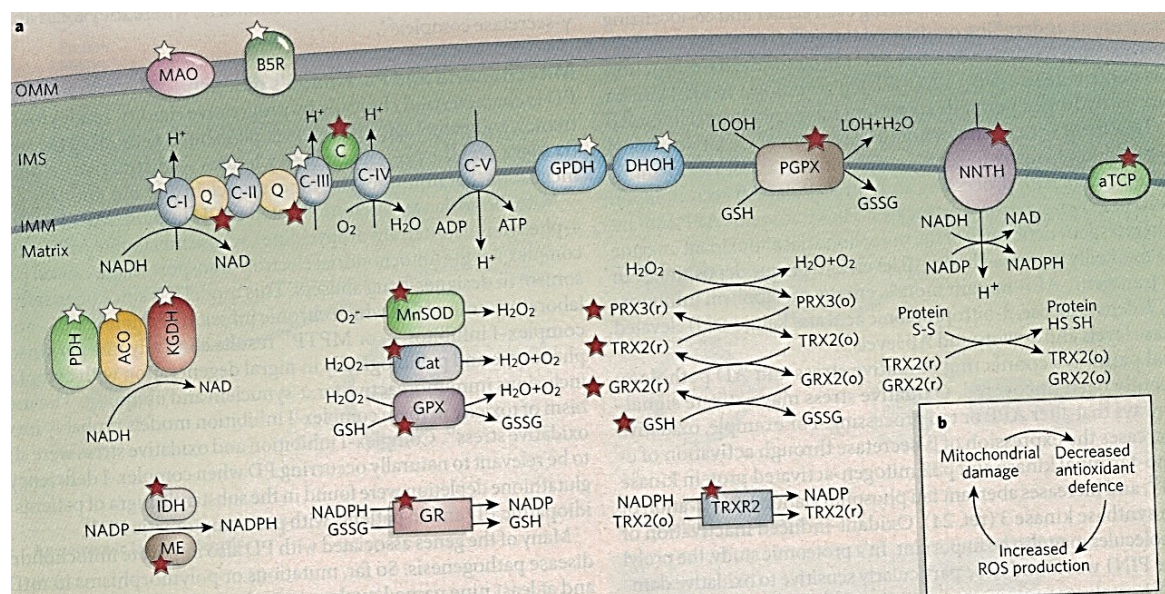
La dérégulation de la signalisation glutamatergique reposerait sur l'augmentation de la relâche du neurotransmetteur glutamate. Cette augmentation reposerait sur la dysfonction des récepteurs NMDA (voir la partie Phencyclidine au 1.2.2.3 « Hypothèse glutamatergique »). Bien que des études démontrent le lien entre la dysfonction des récepteurs NMDA et l'hyperglutamatergie, il reste encore une inconnue sur les sous-unités du récepteur NMDA qui seraient responsables de cette hypofonction (Gordon, 2010). La dysfonction des récepteurs NMDA provoquerait une diminution de l'activité des interneurons inhibiteurs sécrétant du GABA (acide γ -aminobutyrique) qui serait donc responsable d'une désinhibition des neurones glutamatergiques ce qui résulterait en une hyperactivité glutamatergique (Figure 5) (Gordon, 2010).

1.2.2.3 Hypothèse glutamatergique

L'hypothèse glutamatergique dans la schizophrénie reposerait sur la dysfonction des récepteurs NMDA et présente l'avantage de combler les différentes lacunes de la théorie dopaminergique (Laruelle, 2014). La voie dopaminergique projetant vers les régions mésolimbiques présente une augmentation de son activité du fait de l'hypofonction des récepteurs NMDA présents sur les interneurons GABAergiques. L'hypofonction des récepteurs NMDA serait responsable d'une désinhibition des neurones glutamatergiques et donc en une augmentation de leur activité. Comme mentionné ci-haut, la théorie repose sur la diminution de la fonctionnalité du récepteur NMDA pouvant être mimée par l'administration de PCP (Phencyclidine) (Schwartz et al., 2012). Plus particulièrement, les interneurons corticaux GABAergiques exprimant la parvalbumine vont avoir une activité rapide diminuée du fait de la diminution d'activation des récepteurs NMDA. Ces interneurons GABAergiques sous-expriment la GAD67 (glutamate décarboxylase de 67 kDa) représentant l'enzyme limitante de la production de GABA dont le précurseur est le glutamate (Gordon, 2010). Une étude chez les souris met en évidence un lien entre la GAD67 et le récepteur NMDA lorsque l'expression de la sous-unité NR1

est diminuée. Cette étude montre que la diminution de la sous-unité NR1 est associée à une diminution de l'expression de la GAD67 (Belforte et al., 2010) faisant ainsi un lien possible entre les voies dopaminergiques et glutamatergiques.

1.3 Stress oxydatif



Le stress oxydatif représente un état au niveau cellulaire qui est agressé par l'oxygène et ces radicaux. C'est un mécanisme naturel pour tout organisme aérobie et nécessaire lorsque celui-ci n'excède pas 1 à 5 % du dioxygène consommé. En cas d'hypoxie, la production de ROS atteindra même jusqu'à 10 % (Chance et al., 1979). Il est principalement causé par les ROS qui sont produits majoritairement dans la mitochondrie (cf 1.4.1 Définition et rôle ; 1.4.1.1 Complexes OXPHOS). Au sein de la mitochondrie, de nombreuses protéines favorisent la production de ROS (étoiles blanche ; Figure 6) et sont donc appelées pro-oxydantes, tandis que d'autres protéines, anti-oxydantes, transforment les ROS en espèces

non toxiques pour les cellules (étoiles rouge ; Figure 6) (Lin et Beal, 2006). La nécessité physiologique des ROS permet entre autres l'activation des protéines découplantes qui sont des canaux (de l'anglais *uncoupling protein* (UCP)) permettant une dissipation des protons dans la mitochondrie (cf 1.4.1.2 Protéines découplantes) lorsque la mitochondrie a produit trop d'ATP.

1.3.1 Statut et molécules pro-oxydantes

Il existe plusieurs types de molécules pro-oxydantes formant les RONS (espèces réactives d'oxygène et d'azote), tels que les métaux de transition, les complexes I, II et III, la MAO, etc.

Les ROS représentent quatre molécules que sont l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le radical hydroxyle (OH^{\cdot}), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et l'oxygène singulet (1O_2). Le H_2O_2 est le principal ROS formé, mais le moins délétère.

Les métaux de transition, dont le Fe^{2+} (ion ferreux) et le Cu^{2+} (ion cuivrique) ne sont pas directement pro-oxydants, mais ont la particularité de réagir avec le H_2O_2 par la réaction de Fenton qui se déroule dans la mitochondrie et génère le radical hydroxyle (Valle et al., 2010).



Le radical OH^{\cdot} formé lors de la réaction de Fenton est le radical le plus toxique des ROS, car il réagit avec un grand nombre de composés organiques (Minotti et Auste, 1987).

Les RONS quant à eux regroupent le monoxyde d'azote (NO), qui est utile dans le tonus vasculaire et la neurotransmission. Le NO est susceptible de former le peroxynitrite ($HOONO$), qui est un oxydant

capable d'altérer des molécules organiques au même titre que le OH^\bullet (Beckman, 1996).

Les cibles d'interaction principales de ces différentes molécules pro-oxydantes sont l'ADN (Acide désoxyribonucléique), les protéines, les lipoprotéines et les molécules anti-oxydantes.

1.3.2 Statut et molécules anti-oxydantes

Tout comme pour les molécules pro-oxydantes, il existe différents types de molécules anti-oxydantes qui se regroupent sous forme d'enzymes, de protéines non enzymatiques et de métaux.

Les principales enzymes anti-oxydantes sont les superoxydes dismutases (SOD), les glutathion peroxydases (GPxs), ainsi que la thiorédoxine réductase (Trx2). Le rôle majeur de la SOD et de la GPxs se situe dans la mitochondrie pour la détoxification des O_2^\bullet formés par la chaîne respiratoire (figure 6) (cf 1.4.1.1.1 Chaîne respiratoire) La Trx2 permet quant à elle de rompre les ponts disulfures des protéines (Valle et al., 2010).

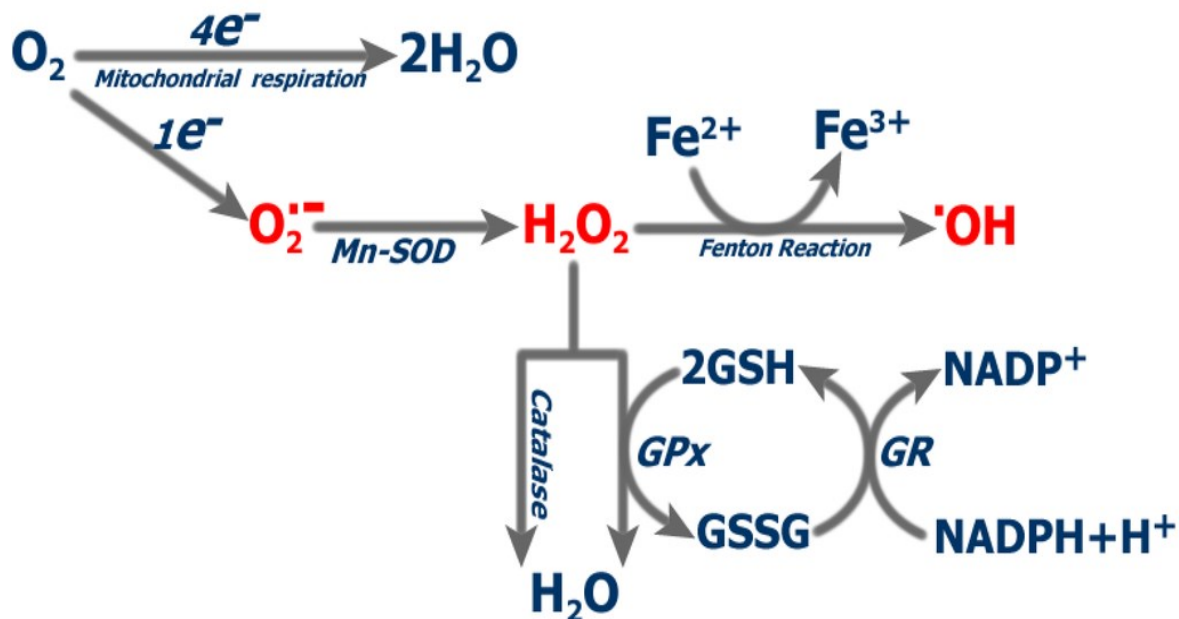


Figure 7 : Détoxification des espèces réactives d'oxygène produites par la chaîne respiratoire de la mitochondrie. O_2 dioxygène ; e^- électron $O_2^{\bullet-}$ anion superoxyde ; H_2O_2 peroxyde d'hydrogène ; $\bullet OH$ radical hydroxyle ; H_2O eau ; GSH/GSSG glutathion/glutathion peroxydé ; GPx glutathion peroxydase ; GR glutathion réductase ; Mn-SOD manganèse-superoxyde dismutase ; $NADPH, H^+$ Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (Figure issue de (Valle et al., 2010)).

Les molécules non enzymatiques anti-oxydantes regroupent la glutathion (GSH) (Figure 7), les vitamines C et E, la Coenzyme Q10, etc. Elles permettent de piéger les radicaux libres et de les réduire.

1.3.3 Stress oxydatif et schizophrénie

De nombreuses études montrent un lien entre le stress oxydatif et la schizophrénie. Dans le système nerveux central associé au développement de la schizophrénie, l'antagonisme des récepteurs NMDA induit une augmentation de la production de ROS et inversement, une surproduction de ROS peut antagoniser les récepteurs NMDA (cf 1.4.2.4 Effet du stress oxydatif). Comme discuté plus haut, la dopamine peut faire l'objet d'une auto-oxydation ou d'une oxydation enzymatique, et les concentrations dopaminergiques plus élevées démontrées dans la schizophrénie pourraient contribuer au stress oxydatif striatal par exemple. Enfin, il existe un

stress oxydatif systémique, lié par exemple à un état métabolique ou au tabagisme. Par ailleurs, Prabakaran et al., (2004) font le lien entre le stress oxydatif et le métabolisme médié par la mitochondrie.

1.4 Mitochondrie

1.4.1 Définition et rôle

La mitochondrie est un organe intracellulaire qui, selon la théorie endosymbiotique primaire, est issue de l'endosymbiose primaire d'une α -protéobactérie par une cellule protoeucaryote (Archibald, 2015). Cette endosymbiose primaire a permis à l' α -protéobactérie d'être recouverte d'une seconde membrane et de former la mitochondrie actuelle. Ainsi, la mitochondrie actuelle est formée d'une membrane externe lisse et d'une membrane interne plissée délimitant un espace intermembranaire acide (concentré en proton) (Carlson et Yan, 2014). Son rôle est de fournir de l'ATP pour le fonctionnement de la cellule, l'ATP étant la molécule énergétique ubiquitaire de l'organisme.

1.4.1.1 Complexes OXPHOS (phosphorylation oxydative)

La mitochondrie comporte de nombreuses protéines, dont les plus importantes restent les protéines des complexes OXPHOS regroupant les complexes de la chaîne respiratoire ainsi que l'ATP synthase, concentrés au niveau des crêtes pour optimiser les réactions (Kawamata et Manfredi, 2017) (Carlson et Yan, 2014).

1.4.1.1.1 Chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire (de l'anglais *electron transport chain* (ETC)), est constituée de 4 complexes que sont la (1) NADH : ubiquinone oxydoréductase (complexe I ou NADH déshydrogénase), (2) la succinate : ubiquinone oxydoréductase (complexe II), (3) la ubiquinol : cytochrome-c oxydase (complexe III) et (4) la cytochrome-c oxydase (complexe IV) (Koopman et al., 2012). La chaîne respiratoire présente deux fonctions prépondérantes, soit la production d'un gradient de protons (qui sera utilisé par l'ATP synthase) et le transfert d'électrons pour transformer l'O₂ en H₂O.

(1) Le complexe I est codé par 7 gènes structuraux d'origine mitochondriale et de 48 gènes nucléaires (37 structuraux, 11 facteurs d'assemblage) (Koopman et al., 2012). La partie intramembranaire du complexe I est constituée des protéines ND1, ND2, ND3, ND4 ND4L, ND5, ND6 (Hirst, 2013) formant la partie ancrée à la membrane interne de la mitochondrie. Le complexe I constitue la première unité de réaction de la chaîne respiratoire dont le rôle est de transformer le NADH (Nicotinamide adénine dinucléotide réduite) en NAD⁺ + H⁺ (Hirst, 2013). Les protons formés sont expulsés vers l'espace intermembranaire par les sous-unités ND2, ND4 et ND5 formant un antiport Na⁺/H⁺ et durant la réaction, des électrons seront libérés et pris en charge par la Coenzyme Q₁₀ pour être transférés vers le complexe III (Ben-Shachar, 2017) (Hirst, 2013).

(2) Le complexe II est codé de 6 gènes nucléaires (4 structuraux- 2 facteurs d'assemblage) (Koopman et al., 2012). Il est composé de 4 protéines, dont la cybL (SDHC (sous-unité c de la succinate déshydrogénase ou complexe II)) et la CybS (SDHD) forment le cytochrome b et représentent la partie ancrée à la membrane aussi nommée l'hème, la sous-unité Ip (de l'anglais *Iron-sulfur protein subunit*) appelée également SDHB et de la sous unité Fp (de l'anglais *Flavoprotein subunit*) (Miyadera et al., 2003). Le complexe II transforme le succinate en

fumarate en transformant du FADH₂ (Flavine adénine dinucléotide réduite) en FAD⁺ (Flavine adénine dinucléotide oxydée), Il représente la seconde voie d'engagement pour la chaîne respiratoire.

(3) Le complexe III est codé par 1 gène structural d'origine mitochondriale et de 12 gènes nucléaires (10 structuraux - 2 facteurs d'assemblage) (Koopman et al., 2012). Le complexe III se divise en 3 parties distinctes, l'une étant dans l'espace intermembranaire, une transmembranaire et la dernière est située dans la matrice (Iwata et al., 1998). La partie située dans l'espace intermembranaire est constituée de la sous-unité 8 du cytochrome c₁ et de l'ISP (Iwata et al., 1998), la partie transmembranaire est composée des sous-unités 7, 10 et 11 ainsi que du cytochrome b (constitué de Heme b_L et b_H) et enfin la partie située dans la matrice mitochondriale est constituée des sous-unités 6 et 9 ainsi que des Core 1 et 2 (Iwata et al., 1998). Le rôle du complexe III est d'entretenir le gradient de proton et de transférer les électrons reçus des complexes I et II vers le complexe IV (Iwata et al., 1998). C'est donc un complexe qui peut être qualifié de « relai ».

(4) Le complexe IV est codé par 3 gènes structuraux d'origine mitochondriale et de 29 gènes nucléaires (11 structuraux - 18 facteurs d'assemblage) (Koopman et al., 2012). Le complexe IV est constitué d'un *Core* ancré dans la membrane interne de la mitochondrie, celui-ci est constitué des sous-unités I, II et III la seconde partie est constituée des sous-unités IV, Va, Vb, VIa, VIb, VIc, VIIa, VIIb, VIIc, et VIII (Herrmann et al., 2003). Le complexe IV représentant le complexe terminal de la chaîne respiratoire a pour rôle de capter les électrons formés et transférés d'un complexe à un autre pour s'en servir afin de transformer l'O₂ en H₂O. 1 à 5 % de l'O₂ utilisé forme des espèces ROS (Clay et al., 2011).

1.4.1.1.2 ATP synthase

1.4.1.1.2.1 Structure

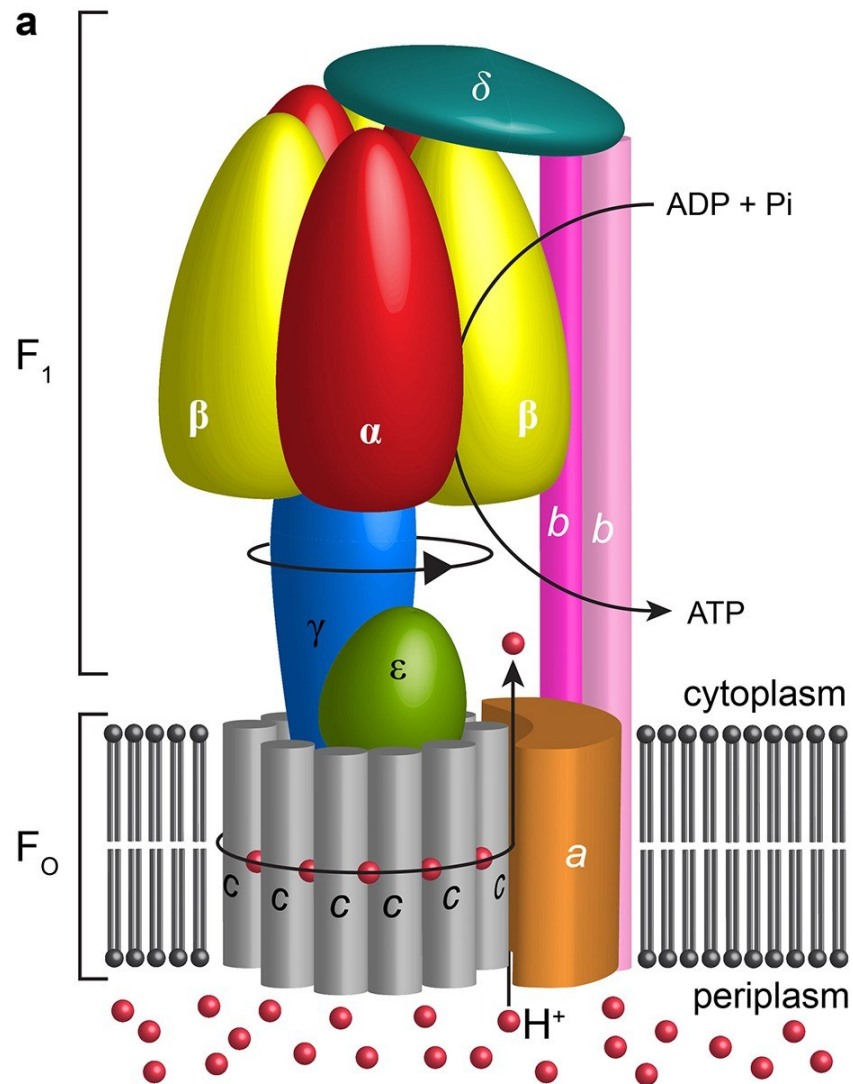


Figure 8 : Structure de l'ATP synthase. H^+ protons ; ATP Adénosine triphosphate ; ADP+Pi Adénosine diphosphate + phosphate inorganique (Figure issue de Sobti et al., 2019).

La F_0 - F_1 ATP synthase est constituée des deux parties, l'une appelée *rotor* (F_0) et l'autre nommée le *stator* (F_1). Le *rotor* est constitué de 1 sous-unité α , 2 sous-unités b et de 10 à 12 sous-unités c , ainsi que de

2 demi-canaux protoniques. Le *stator* est constitué de 3 sous-unités α , 3 sous-unités β et d'une sous-unité γ , δ et ϵ (Arechaga et Jones, 2001). Cependant, la partie rotative est constituée des sous-unités γ , ϵ et de 10 à 12 sous-unités c (Arechaga et Jones, 2001).

1.4.1.1.2.2 Fonctionnement

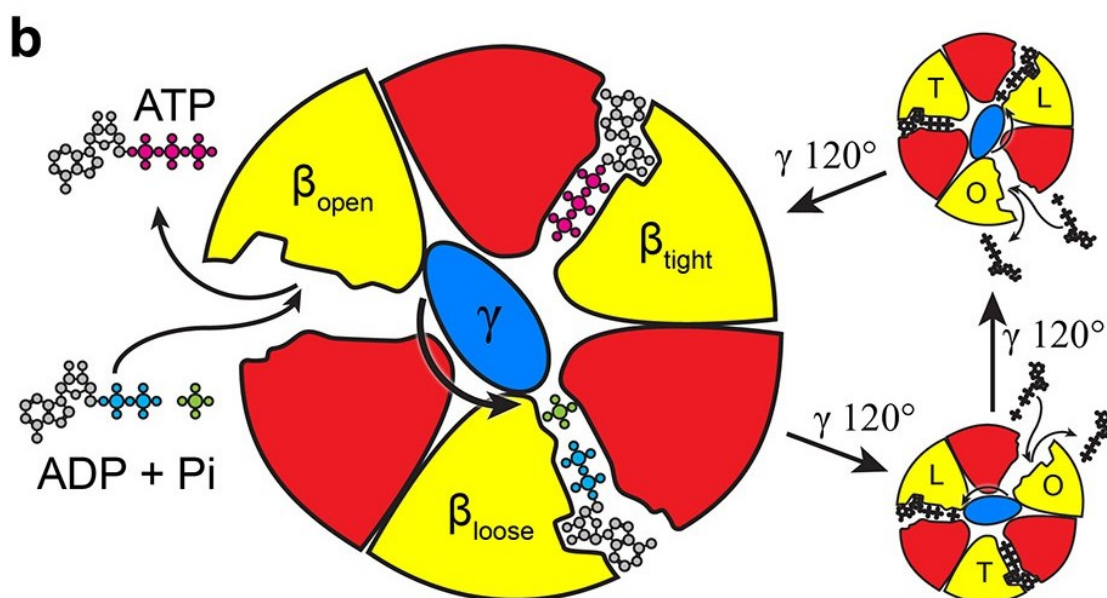


Figure 9 : Fonctionnement des sous-unités β de l'ATP synthase. ATP Adénosine triphosphate ; ADP+Pi Adénosine diphosphate + phosphate inorganique ; O forme *open* ; L forme *loose* ; T forme *tight* ; β sous unité β de l'ATP synthase (Figure issue de Sobti et al., 2019)

La F_0 - F_1 ATP synthase utilise une énergie chimique provenant des protons qui se lient au groupement aspartate (cf 1.4.1.1.2.1 Figure 8) présent sur les sous-unités c afin de provoquer une rotation de la sous-unité γ . Cette énergie chimique est utilisée par la sous-unité γ qui sera utilisable par les sous-unités β qui présentent 3 formes, nommées *open*, *tight* et *loose* (Arechaga et Jones, 2001) (Shu et al., 2010). La forme *open* permet l'échange de l'ATP formé par de l'ADP (Adénosine diphosphate) et du Pi (Phosphate inorganique), la forme *loose* présente correctement l'ADP et le Pi et enfin la forme *tight* transforme l'ADP+Pi en ATP

(Shu et al., 2010). Chaque sous-unité β est présente dans chacune de ces 3 formes distinctes à tour de rôle et ainsi, la rotation de la sous-unité γ permet le changement simultané de conformation des 3 sous-unités β (Figure 9). Ainsi à chaque rotation de 120 degrés de la sous unité γ un ATP sera produit. Par ailleurs, l'ATP synthase présente une double fonction qui est de produire de l'ATP, mais également de l'hydrolyser en ADP+Pi.

1.4.1.1.3 Cycle de Krebs

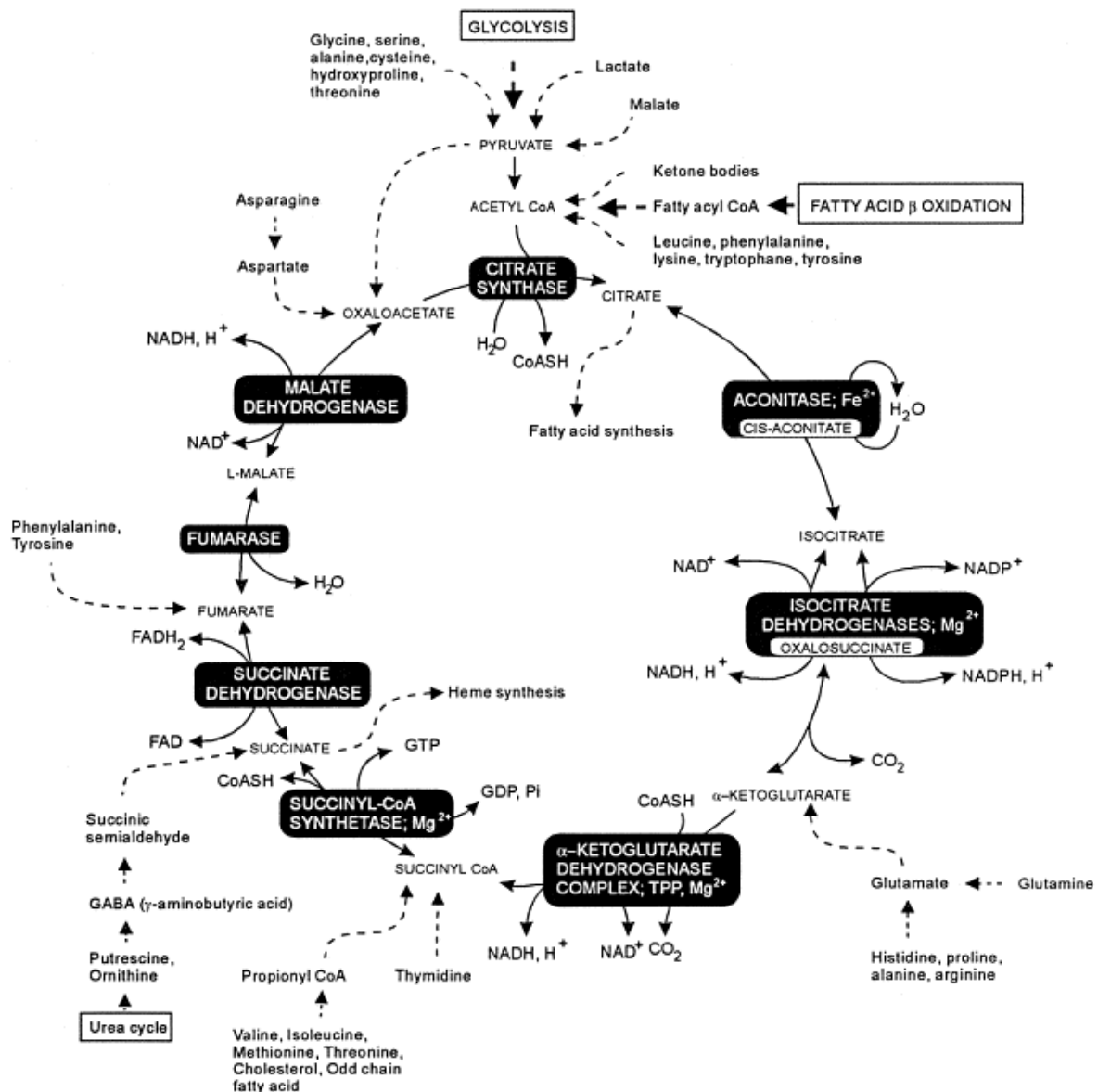


Figure 10 : Cycle de Krebs H₂O eau ; CoASH Coenzyme A ; Fe²⁺ ions ferreux ; NAD⁺ Nicotinamide adénine dinucléotide oxydée ; NADH,H⁺ Nicotinamide adénine dinucléotide réduite ; NADP⁺ Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydée ; NADPH,H⁺ Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduite ; CO₂ Dioxyde de carbone ; GDP guanosine diphosphate ; GTP guanosine triphosphate ; Pi phosphate inorganique ; FAD Flavine adénine dinucléotide oxydée ; FADH₂ Flavine adénine dinucléotide réduite ; TPP Thiamine pyrophosphate ; Mg²⁺ ions magnésium (Figure issue de (Rustin et al., 1997)).

Le cycle de Krebs ou TCA (Cycle des acides tricarboxyliques de l'anglais *tricarboxylic acid cycle*) est une suite de réactions enzymatiques qui se produit dans la matrice mitochondriale et ayant pour rôle de fournir les cofacteurs nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Le

cycle de Krebs est constitué de 8 réactions dont seules 2 réactions sont irréversibles (Figure 10). Il y aura donc un équilibre entre chacun des produits et des substrats (Rustin et al., 1997). Il y a cependant une enzyme particulière qui est la succinate déshydrogénase représentant le complexe II de la chaîne respiratoire ce qui implique que les réactions du cycle de Krebs sont périmembranaires. Le bilan énergétique de la production d'ATP lors de la respiration aérobie en débutant avec le glucose cytoplasmique sera de 38 ATP par molécule de glucose (tableau 2).

	glucose	NADH,H ⁺	FADH ₂	ATP	GTP	Équivalent ATP
<i>Glycolyse</i>	2 pyruvates	2	0	-2 +4	0	8
<i>PDH</i>	2 acétyl-CoA	2	0	0	0	6
<i>TCA</i>		6	2	0	2	24
<i>total</i>						38

Tableau 2 : Bilan énergétique de la respiration aérobie en débutant du glucose cytoplasmique. PDH pyruvate déshydrogénase ; TCA Cycle des acides tricarboxyliques (de l'anglais *tricarboxylic acid cycle*) ; ATP adénosine triphosphate ; GTP guanosine triphosphate ; FADH₂ Flavine adénine dinucléotide réduite ; NADH Nicotinamide adénine dinucléotide réduite.

Il existe cependant une réaction qui se produit lorsque les niveaux d'ATP et de CO₂ (HCO₃⁻ dans sa forme soluble) sont trop élevés, soit la réaction de Wood-Werckman qui consiste à transformer le pyruvate en AOA (acide oxaloacétique) au lieu de le transformer en Acétyl-CoA. Cette réaction consommera un ATP par pyruvate. Ceci permet donc de diminuer la production de NADH,H⁺ (équivalent à 3 ATP formés) et de consommer un ATP, pour un delta de production de 4 ATP entre les deux réactions. De plus cette réaction est utilisée lors de la néoglucogenèse pour transformer le pyruvate en AOA qui sera transformé à son tour en phospho-énol pyruvate (PEP).

1.4.1.1.4 Organisation des complexes

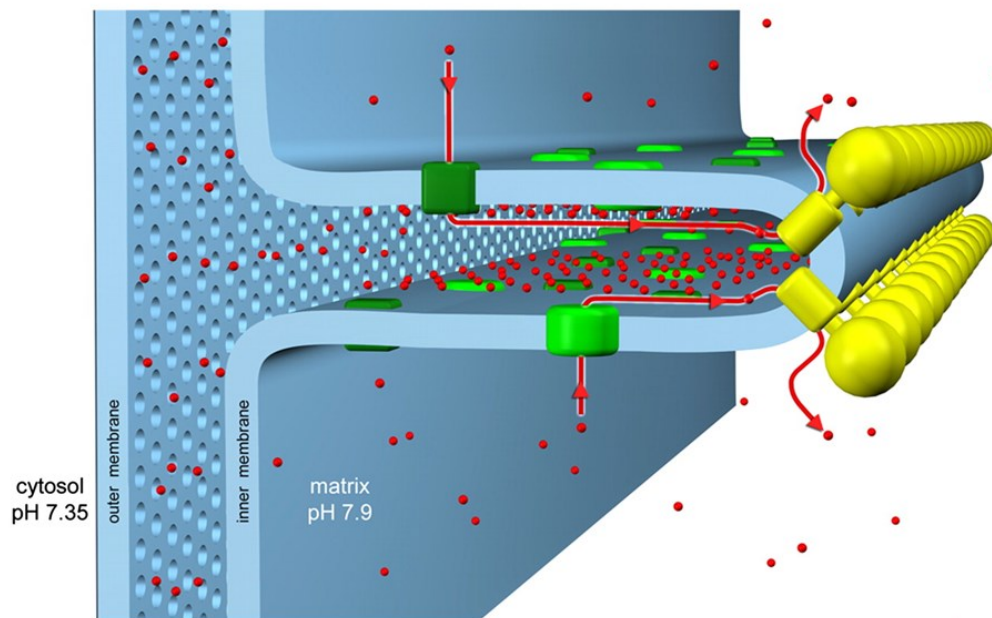


Figure 11 : Répartition des complexes OXPHOS au sein de la membrane interne de la mitochondrie. Jaune ATP synthase ; Vert complexe I ; rouge proton ; flèche rouge flux de protons (cercle rouge) (Figure issue de ((Davies et al., 2011) volumes 108 (34) (14121-14126), include "Copyright Academy (2011) National Academy of Sciences).

Une étude a montré que les F_0 - F_1 ATP synthase formaient des dimères (Davies et al., 2011). Ces dimères d'ATP synthase ont été révélés par cristallographie et sont situés au fond des crêtes (Figure 11). Les complexes I ont été décrits sur la membrane interne de la mitochondrie au niveau des crêtes (Davies et al., 2011), ainsi que les autres complexes (Carlson et Yan, 2014). Comme le montrent les flèches rouges de la figure 11, il y a donc un flux de protons créé entre la chaîne respiratoire qui forme et entretient le gradient protonique pour l'ATP synthase qui utilise ce gradient. Ce mécanisme s'appelle le couplage respiratoire.

1.4.1.2 Protéines découplantes

Les protéines découplantes (de l'anglais *uncoupling proteins* (UCPs)) sont des protéines formées de 6 domaines transmembranaires délimitant un canal (Krauss et al., 2005) (Ježek et Garlid, 1998) (Urban, 2010). Ce sont des canaux protoniques ayant pour effet de dissiper le gradient protonique, mais avec la fonction spéciale de produire de la chaleur (Horvath et al., 2003) (Harper et Brand, 1993) (Fleury et Sanchis, 1999). Une étude a démontré que dans certaines espèces et selon les tissus, cette activité de fuite pouvait représenter de 5 à 50 % de l'activité mitochondriale totale.

Les UCPs sont des canaux protoniques présents sur la membrane interne de la mitochondrie et ils forment avec la chaîne respiratoire un découplage respiratoire (Brand, 2000) c'est-à-dire que les UCPs tendent à diminuer l'efficacité entre l'oxydation et la phosphorylation des complexes OXPHOS. Par ailleurs, il a été démontré que les UCP4 sont localisés dans le microenvironnement du complexe II et elles participent à l'augmentation de la production d'ATP, de la respiration et du niveau de la fuite de proton (Ho et al., 2012).

1.4.1.3 Pathologies associées à des dysfonctions mitochondriales

Le mauvais fonctionnement des mitochondries peut être à l'origine de certains syndromes se manifestant par de multiples symptômes cliniques. Les syndromes affectant la mitochondrie sont regroupés sous le terme clinique de myopathie mitochondriale menant à des dysfonctions dans la chaîne respiratoire et plus particulièrement les complexes I et III (Holt et al., 1988). Certaines de ces myopathies mitochondriales causent des symptômes psychiatriques par exemple le syndrome de Kearns-Sayre, dont certains des symptômes cliniques seront des troubles cognitifs ainsi que des troubles bipolaires (Kato et al., 1997).

1.4.2 Dysfonctions mitochondriales dans la schizophrénie

Comme mentionné dans la partie précédente « 1.4.1.3 Pathologies associées à des dysfonctions mitochondriales », les syndromes peuvent affecter l'activité mitochondriale, mais également se manifester par des troubles psychiatriques.

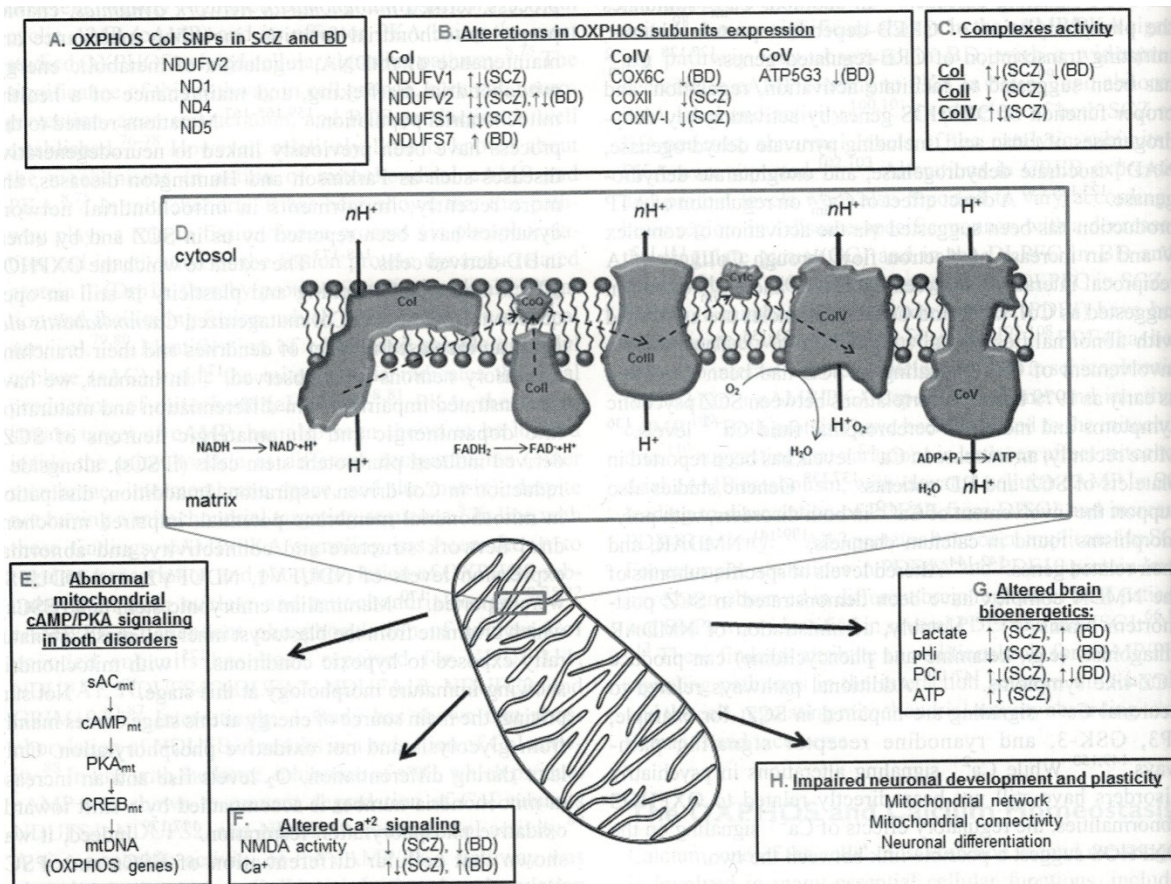


Figure 12 : Regroupement des différentes dérégulations mitochondriales retrouvées dans la schizophrénie (SCZ) et les troubles bipolaires (BD) ↑ augmentation ; ↓diminution (Figure issue de (Bergman et Ben-Shachar, 2016).

Dans la schizophrénie, la mitochondrie est sujette à de nombreux changements (Bergman et Ben-Shachar, 2016) (Figure 12).

1.4.2.1 Anomalie bioénergétique

Une étude s'est intéressée à explorer l'activité mitochondriale de la NADH déshydrogénase (complexe I) chez des patients schizophrènes en comparant des groupes traités et non traités par rapport à un groupe contrôle (Ben-Shachar et al., 1999). Dans cette étude, il a été démontré que l'activité du complexe I est augmentée chez les patients schizophrènes, qu'ils soient sous une médication ou non. Il y a cependant une limite à cette étude, car celle-ci est effectuée sur des patients vivants, ainsi, les auteurs n'ont pu utiliser que les plaquettes sanguines périphériques et n'ont pas pu explorer l'activité dans différentes régions du cerveau.

1.4.2.2 Effet de la dopamine sur les fonctions mitochondriales

Plusieurs études ont démontré un effet inhibiteur de la dopamine sur le complexe I et plus particulièrement au troisième stade de la respiration (Berman et Hastings, 2003) (Ben-Shachar et al., 2004). De façon intéressante, une étude a démontré que la dopamine présentait également un effet inhibiteur sur l'activité du complexe IV, et que l'activité de la GSH antagonise l'effet de la dopamine pour restaurer l'activité du complexe I et du complexe IV (Khan et al., 2005).

1.4.2.3 Effet du glutamate sur les fonctions mitochondriales

Le glutamate est à la fois un neurotransmetteur (cf 1.2.2 Voies glutamatergiques), mais également un précurseur servant à la formation d' α -cétoglutarate via l'enzyme GDH (glutamate déshydrogénase) (Ahn et Metallo, 2015) et donc à l'activation du cycle de Krebs (cf 1.4.1.1.3 Cycle de Krebs). Une étude dans des astrocytes en culture a démontré que l'ajout de glutamate induit une chute du pH mitochondrial dans l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale, reflétant une activation des complexes OXPHOS. Paradoxalement, l'ajout de glutamate provoque une diminution significative de l'OCR (de l'anglais *oxygen*

consumption rate) et une diminution des ROS mitochondriaux (Azarias et al., 2011).

1.4.2.4 Effet du stress oxydatif

Les ROS sont produits en partie par les complexes I, II et III (cf intro 1.3 Stress oxydatif et 1.3.1 Statut et molécules pro-oxydants) dans la matrice mitochondriale. Les ROS n'ont pas un effet immédiat et à court terme sur l'activité mitochondriale. En revanche, ils produisent des mutations de l'ADNmt (ADN mitochondrial) qui à terme, vont créer des protéines présentant des mutations structurelles et donc fonctionnelles, engendrer des dysfonctions mitochondriales et augmenter la réponse inflammatoire. La production de ROS serait également liée à une hypoactivation des récepteurs NMDA conduisant à une accentuation de la production de ROS, menant à des changements neuro-progressifs voir à la mort des cellules du cerveau (Bitanirwe et Woo, 2011) (Rajasekaran et al., 2015). De plus, une augmentation de la respiration mitochondriale est associée à une augmentation de la production de ROS.

1.4.2.5 Effets des traitements antipsychotiques sur les fonctions mitochondriales

Une étude s'est intéressée aux effets des traitements antipsychotiques sur l'activité mitochondriale et plus particulièrement sur l'activité du complexe I (Prince et al., 1997). Dans cette étude, les rats ont été traités de façon chronique par différents traitements et l'activité du complexe I fut quantifiée 2, 14 ou 28 jours après le début des traitements. Il y apparaît que l'halopéridol diminue l'activité du complexe I dans le striatum, le cortex frontal, l'hippocampe et le cervelet. Cependant, et de façon surprenante, aucune modulation compensatrice de l'activité n'est observée entre les jours 2 et 14, alors que 28 jours après le début du traitement, l'activité du complexe I est rétablie dans l'hippocampe et le cervelet, mais pas dans le cortex frontal ni dans le

striatum. Les auteurs y ont testé d'autres traitements tels que la clozapine, qui n'ont aucun effet sur l'activité du complexe I dans les mêmes régions. Les auteurs ont également étudié l'activité du complexe IV (COX) sous traitement à l'halopéridol, qui a un effet inhibiteur dans le cortex frontal au jour 14, alors qu'au jour 28, cette activité s'en retrouve fortement augmentée. De plus, la clozapine qui n'avait pas d'effet au jour 28 sur l'activité du complexe I présente cette fois une augmentation de l'activité du complexe IV dans le cortex frontal et l'hippocampe. Il apparaît donc que tous les traitements n'auront pas obligatoirement d'effets sur l'activité mitochondriale de la même manière et que certains traitements nécessiteront des injections chroniques pour présenter un effet bénéfique sur l'activité mitochondriale. Par ailleurs, la clozapine et l'halopéridol sont tous les deux des antagonistes des récepteurs DRD2 modulant la neurotransmission dopaminergique, laquelle est un inhibiteur de l'activité mitochondriale (cf 1.4.2.2 Effet de la dopamine sur les fonctions mitochondriales).

1.5 Modèle à double atteinte

Les facteurs environnementaux précoces durant la phase de gestation, telle qu'une infection au virus *influenza*, présenteront un effet modéré sur la prévalence de la schizophrénie (Selten et al., 2010). Le taux élevé d'anticorps d'IgG (immunoglobuline) contre la *toxoplasma gondii* présente également une corrélation avec la schizophrénie (Brown et al., 2005). Durant la phase de l'adolescence, les facteurs environnementaux comme la consommation de drogues et les traumatismes sont considérés comme des facteurs tardifs (Van Os et al., 2010).

Le modèle murin à double atteinte de schizophrénie utilisé dans cette étude a été développé par l'équipe de recherche, et a été décrit à plusieurs reprises (Deslauriers et al., 2013) (Deslauriers et al., 2011) (Monpays et al., 2016). Celui-ci repose sur deux atteintes

environnementales. La première se déroule pendant la période de gestation et provoquera une inflammation gestationnelle, qui créera une vulnérabilité pour la seconde atteinte. Pour cette première atteinte, l'acide polyinosinique-polycytidylique (PIC) est utilisé, c'est un ARN (Acide ribonucléique) double brin synthétique mimant une infection au virus *influenza*. Le PIC est injecté en intrapéritonéal des souris gestantes durant le 12^{ème} jour de gestation (G), ce qui correspond au second semestre de grossesse chez l'humain. Le PIC est un activateur des récepteurs TLR-3 (de l'anglais *Toll-Like Receptor*) initiant ainsi une réponse immunitaire médiée par l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires de l'interleukine-1 β et du TNF- α (de l'anglais *tumor necrosis factor- α*) (Zhang et al., 2013) (Meyer et al., 2006). La réponse immunitaire prénatale induite par le PIC augmente la vulnérabilité à un second facteur stressant postnatal (Bayer et al., 1999). Ce second facteur environnemental est le stress de contention (SC) qui agit en synergie pour induire des perturbations du statut oxydatif, ce qui a pour conséquence de diminuer le niveau de la GAD67 et augmenter les niveaux de DRD2. Ces changements restent présents jusqu'à 24h suivant le dernier stress de contention (Deslauriers et al., 2013) (Deslauriers et al., 2011).

1.6 Traitement

1.6.1 Acide lipoïque

Une première étude du laboratoire a étudié les dysfonctions de la respiration mitochondriale dans le modèle à double atteinte à l'aide d'un traitement antioxydant à l'acide lipoïque (Monpays et al., 2016). Dans cette étude, une suractivation de l'activité respiratoire était liée au complexe I dans le PFC (cortex préfrontal de l'anglais *prefrontal cortex*) et le striatum des souris mâles et femelles. De plus, l'activité du complexe II dans le PFC des mâles et femelles et le striatum des mâles seulement était augmentés de façon notable. L'acide lipoïque normalisait

l'activité respiratoire du modèle dans le PFC et présentait une tendance à la baisse de l'activité respiratoire dans le striatum.

Outre ses propriétés antioxydantes, l'acide lipoïque est également un cofacteur utilisé lors de la transformation de l' α -cétoglutarate en Succinyl-CoA (cf 1.4.1.1.3 Cycle de Krebs). Ci-bas la réaction simplifiée de la transformation (Figure 13 flèche verte).

Cependant, la réaction (flèches noires) complète nécessite 3 enzymes (E_1 - E_2 - E_3), mais également un cofacteur qu'est l'acide lipoïque (rouge Figure 13) impliquant celle-ci dans l'activité du cycle de Krebs et de la formation de cofacteur de la respiration mitochondriale.

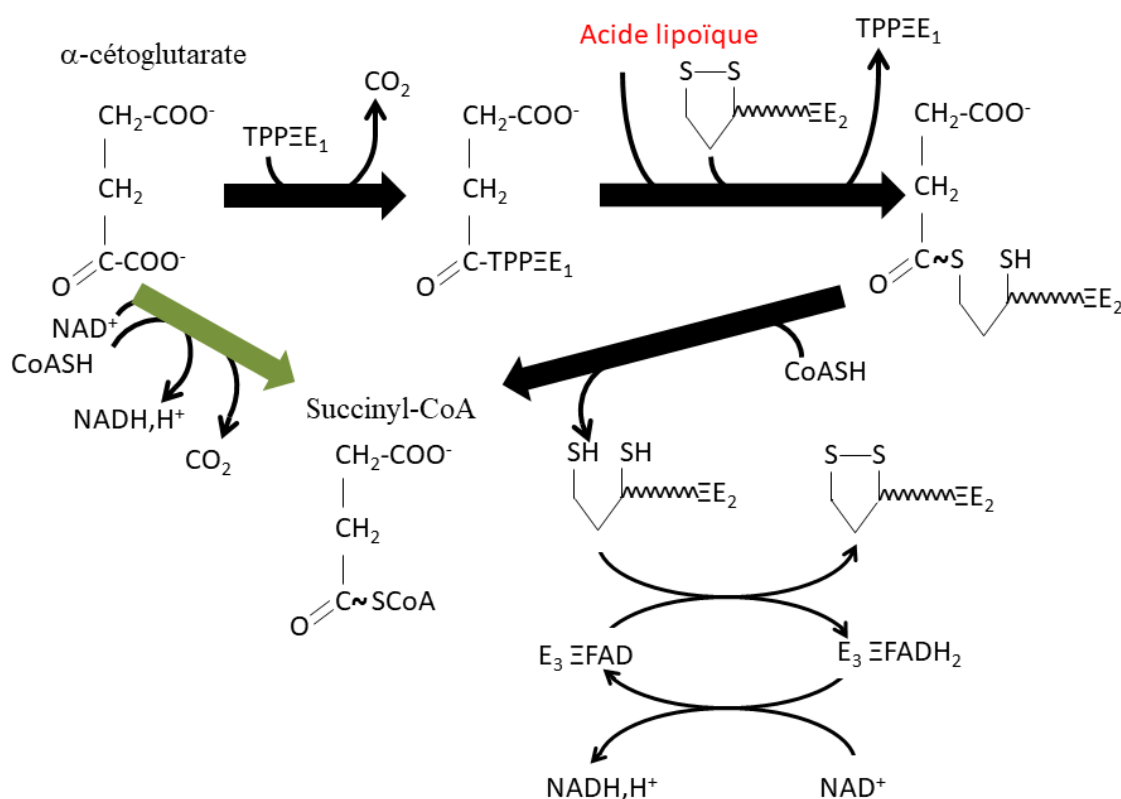


Figure 13 : Réaction de la transformation de l' α -cétoglutarate en Succinyl-CoA. Flèche verte réaction simplifiée ; flèche noire réaction détaillée.

L'acide lipoïque présente également une seconde fonction importante au sein de la mitochondrie. En effet, par sa fonction

d'antioxydant (cf 1.3.2 Statut et molécules antioxydantes) ce composé permet le maintien du ratio GSH/GSSH (cf 1.3.2 Statut et molécules antioxydantes Figure 7).

L'acide lipoïque présente une troisième fonction importante qui est en réalité une fonction sous-jacente à son rôle d'antioxydant. En effet comme mentionné ci-contre et au point « 1.4.2.2 Effet de la dopamine sur les fonctions mitochondriales », l'acide lipoïque permet le maintien du ratio de la GSH qui joue un rôle d'antagoniste de la dopamine pour restaurer la fonction de l'activité du complexe I et IV (cf 1.4.2.2 Effet de la dopamine sur les fonctions mitochondriales).

L'acide lipoïque est donc nécessaire pour le bon fonctionnement du cycle de Krebs, pour le processus de détoxification des ROS dans la mitochondrie et pour la régulation de ces fonctions.

1.6.2 1-méthyl-DL-tryptophane

Schizophrenia

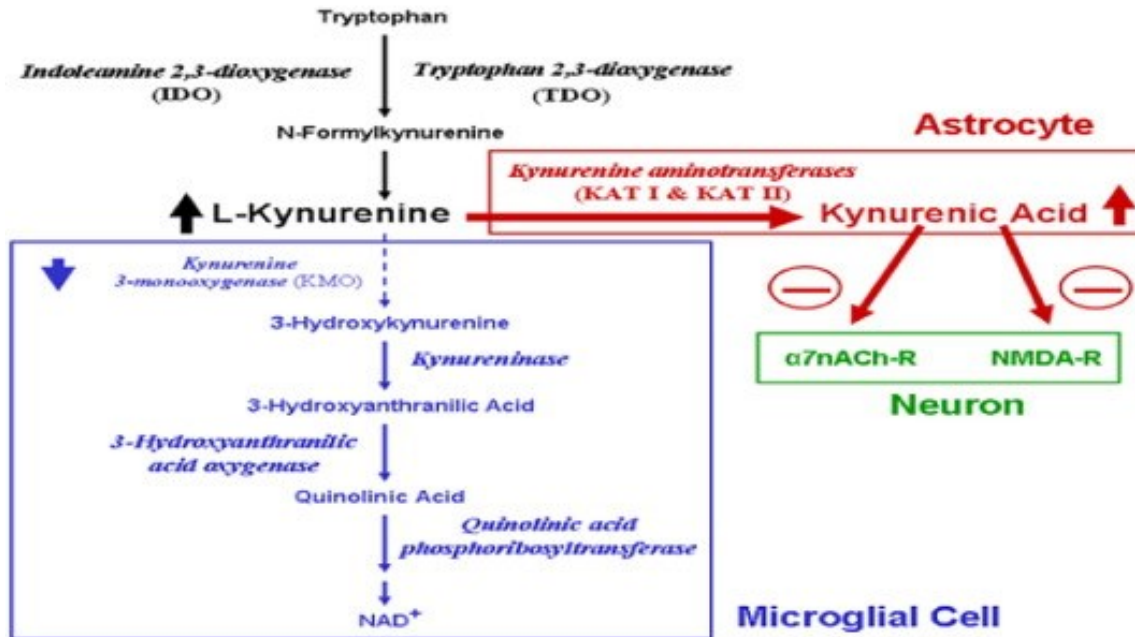


Figure 14 : Dérégulation de la voie d'acide kynurénique dans la schizophrénie. ↓ Diminution de la quantité ; ↑ augmentation de la quantité ; - dans un cercle d'inhibition. (Figure issue de (Koola, 2016).

Dans la schizophrénie, de plus en plus d'évidences montrent un lien entre l'altération de la voie de synthèse de la L-Kynurénine et les déficiences cognitives (Koola, 2016). En effet, l'augmentation de la production de la L-Kynurénine touchera deux voies, soit celle de l'acide quinolinique (QA) dans les cellules de la microglie et celle de la synthèse de l'acide kynurénique (KYNA) dans les astrocytes (Figure 14) (Koola, 2016). La kynurénine est augmentée dans l'aire numéro 9 de Brodmann de + 62 % (+ 30 % dans l'aire 19 de Brodmann) et du KYNA + 54 % dans l'aire numéro 9 de Brodmann (Schwarcz et al., 2001). Il est à noter que l'augmentation du KYNA aurait un effet sur le PFC. Le KYNA serait un inhibiteur des récepteurs NMDA ce qui provoquerait une augmentation du taux de glutamate extrasynaptique causant une excitotoxicité neuronale (cf introduction 1.2.2.2 Dérégulation de la voie glutamatergique). Le 1-méthyl-DL-tryptophane est un inhibiteur de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) qui est l'une des deux enzymes

permettant de transformer le tryptophane en L-Kynurénine, et pourrait ainsi contribuer à lever l'inhibition qu'exercerait le KYNA sur le récepteur NMDA.

1.7 Hypothèse – Problématique

L'inflammation gestationnelle induite par le PIC médiée via l'activation du TLR3 entraîne une réponse inflammatoire (cf 1.5 Modèle à double atteinte) ainsi que des anomalies comportementales et un stress oxydatif qui perdureront à l'âge adulte (Meyer, 2014) (Boksa, 2010).

D'autre part, des résultats non publiés du laboratoire (Thèse J.Deslauriers; 2014) montraient que les souris du modèle à double atteinte présentaient une surexpression de l'IDO - l'une des deux enzymes limitantes dans la formation du KYNA - repérable aux niveaux de la protéine et de l'ARN messager. De plus, le 1-MT normalisait le PPI des souris du modèle, suggérant une implication de l'IDO dans les phénomènes observés.

Au vu de l'étude antérieure et des résultats obtenus avec le traitement par l'acide lipoïque, ainsi que des résultats mentionnés ci-dessus, l'objectif principal de ce projet était de vérifier une implication éventuelle de la voie IDO/KYNA dans les dérégulations de l'activité mitochondriale.

L'idée sous-jacente du travail est donc que les dérégulations de l'activité mitochondriale dans le modèle murin à double atteinte de schizophrénie sont causées par l'augmentation du glutamate en lien avec l'augmentation de la production d'acide kynurénique astrocytaire et, le

traitement au 1-méthyl-DL-tryptophane permet de restaurer les fonctions normales de la mitochondrie.

D'où l'hypothèse de travail qu'une diminution du KYNA induite par le traitement 1-méthyl-DL-tryptophane restaure les fonctions mitochondriales

Les objectifs sont, dans le modèle à double atteinte, par rapport aux contrôles,

- D'identifier les troubles de l'activité respiratoire et de la production d'ATP
- Avec pour sous objectif d'évaluer l'existence et les modulations de la respiration de fuite mitochondriale.
- D'évaluer les niveaux d'expression des protéines UCP2, UCP4 et des complexes OXPHOS
- Déterminer si le traitement au 1-MT permet de restaurer l'activité respiratoire, la production d'ATP et l'expression protéique confirmant que l'origine des dérégulations de l'activité mitochondriale est due à l'augmentation de la production de KYNA dans les astrocytes.

2. Matériel et méthode

2.1 Animaux

Les souris C57BL6 mâles et femelles (âgées de 8 à 10 semaines) ont été obtenues de Charles River laboratories (Colonie K96, ON, Canada). Les souris ont été hébergées dans une pièce dont la température a été maintenue à 20°C et soumises à des cycles de 14 h lumière / 10 h d'obscurité avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de la recherche sur les animaux de l'Université de Sherbrooke, en accord avec le Conseil canadien de protection des animaux.

2.2 Modèle à double atteinte

Les souris obtenues ont été utilisées pour réaliser des reproductions. Les souris gestantes ont été injectées en intrapéritonéal (IP) au jour gestationnel 12 (G12) à raison de 20 mg/kg de PIC (Sigma-Aldrich, ON, Canada) ou de solution saline. Les souris juvéniles ont été isolées de leur mère en fonction de leur sexe au jour postnatal 21 (PN21). Durant les jours PN33-35, les souris juvéniles ont été injectés avec une solution de 50 mg/kg de 1-méthyl-DL-tryptophane (1-MT) (860646 (Sigma-Aldrich, ON, Canada)) dissous dans 17 % HCl/Saline tamponné avec du NaOH à un pH 7.0 ou par le véhicule. Le groupe contrôle (souris juvénile des mères injectées en IP par de la solution saline) a été isolé 3 h post-injection durant 2 h dans de nouvelles cages. Les souris du modèle (mère injectée en IP avec du PIC) ont été soumises à un stress de contention (SC) (Figure 15) dans des tubes Falcon 50 mL coupés à la taille des souris. Durant le stress de contention et l'isolement social, les souris n'ont pas eu accès à l'eau et à la nourriture. Au jour PN36, les souris ont été euthanasiées, puis le PFC et le striatum ont été rapidement prélevés pour la préparation tissulaire et l'extraction mitochondriale.

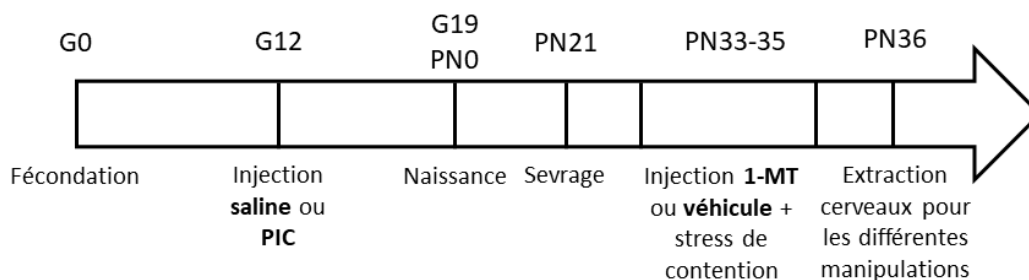


Figure 15 : Axe temporel du modèle et du contrôle. G (jour gestationnel) ; PN (jour postnatal).

2.3 Préparation tissulaire et extraction mitochondriale

Le protocole utilisé est modifié de Monpays et al., (2016). Le striatum et le PFC ont été immédiatement placés sur glace dans 200 μ L de tampon d'isolation fraîchement préparé (IB_A) (EGTA 1 mM, HEPES 5 mM, acide gras libre sérum-albumine bovin (BSA) 1 mg/mL, sucrose 75 mM, mannitol 225 mM, puis tamponné à pH 7.2). Les échantillons tissulaires contenus dans les 200 μ L IB_A ont été transférés dans un Potter de 2 mL (2 mL Dounce tissue grinder (Kontes Glass Co., Vineland, NJ, USA)) contenant 400 μ L d'IB_A afin de broyer et d'homogénéiser les tissus. Deux rinçages avec 400 μ L d'IB_A ont été réalisés. Le volume final a été ajusté à un volume de 1.9 mL avant d'être centrifugé à 1,941 g durant 2 min (4 °C). Le surnageant a ensuite été divisé dans deux tubes Eppendorf de 2 mL contenant 750 μ L de surnageant et 75 μ L de Percoll 80 % dilués dans du tampon de lavage (EGTA 0.1 mM, HEPES 5.0 mM, sucrose 250 mM, la solution a été tamponnée à un pH 7.2) frais du jour. Les échantillons ont été délicatement déposés par-dessus du Percoll 10 % (Percoll 80 % dilué dans de l'IB_A) pour obtenir deux phases distinctes puis les échantillons ont été centrifugés à 15,570 g durant 10 min (4 °C). Le culot a été lavé à trois reprises dans du tampon de lavage (décrit précédemment) et centrifugé à 16,060 g durant 5 min (4 °C). Le culot final a été homogénéisé dans 250 μ L de tampon de lavage puis gardé sur glace afin d'être utilisé dans les manipulations d'activité respiratoire et de mesure d'ATP. Le restant des échantillons a été conservé dans un congélateur pour être réutilisé pour les buvardages de type Western.

2.4 Mesure de la respiration mitochondriale

Le protocole utilisé est modifié de Monpays et al., (2016). L'essai repose sur le *quenching* de la sonde par l'O₂. La sonde est ici le *reporter* (émetteur de la fluorescence) qui sera excité lors de la lecture, mais, cette excitation sera transmise au *Quencher* (l'O₂) qui récupère l'énergie excitatrice de la sonde lorsqu'ils sont proches. Ainsi la sonde est dite *quenchée* par l'O₂ et ne pourra émettre une fluorescence que lorsque l'O₂ sera consommé. La respiration a été mesurée par l'augmentation de la fluorescence traduisant donc une consommation de l'oxygène. Un dosage préliminaire de chaque échantillon a été réalisé par Coomassie Plus (Bradford) Protein Assay Reagent (Thermo Fisher Scientific, IL, USA) afin d'en déterminer la concentration de protéine mitochondriale finale. Les échantillons ont été dilués à raison de 500 µg/mL (KCl 15 mM, MgCl₂ 5 mM, sucrose 250 mM, EDTA 1 mM, K₂HPO₄ 30 mM et la solution a été tamponnée à un pH 7.4) dans du tampon de respiration fraîchement préparé du jour afin d'utiliser 25 µg de protéines par puits. La respiration mitochondriale a été étudiée à l'aide du kit MitoXpress commercial kit (Cayman Chemical Company, MI, USA) et de 4 substrats différents préparés dans du tampon de respiration : activation (1) du complexe I (ADP 1.65 mM, glutamate et malate 12.5 mM par puits) ; (2) de la respiration lors de l'activité de fuite (Oligomycine 1.00 µM, glutamate et malate 12.5 mM, succinate 25.0 mM et ADP 1.65 mM) ; (3) du complexe II (Roténone 0.50 µM, ADP 1.65 mM, glutamate et malate 12.5 mM et succinate 25.0 mM) et enfin (4) co-activation du complexe I et II (glutamate et malate 12.5 mM, succinate 25.0 mM et ADP 1.65 mM). Chaque puits contenait 100 µL de sonde diluée (10 pmol de sonde par puits); 50 µL de protéines mitochondriales et 50 µL de solution de substrats 1, 2, 3 ou 4 (précédemment décrit) puis, chaque puits a été scellé par de l'huile fournie dans le kit pour isoler les solutions de l'oxygène ambiant. Chaque mesure est réalisée en *triplicata*. Le contrôle positif (Glucose (1.5 mg/puits) 50 µL, sonde diluée 100 µL, glucose oxydase

100 μL et d'huile du kit) a été mesuré pour déterminer la condition où tout l'oxygène a été consommé. Le contrôle négatif (substrat 100 μL , sonde diluée 100 μL et de l'huile) a été réalisé pour déterminer la condition où l'oxygène n'a pas été consommé dans le puits c'est-à-dire qu'il y reste 7,52 mg.L^{-1} de dioxygène. La plaque a été placée immédiatement dans le lecteur de plaque Infinite®-M1000 (Tecan) préchauffer à 30 °C. Le protocole de fluorescence en temps différé (TR-F) a été lancé pour lire la plaque à intervalle régulier de 2 min, de longueur d'onde d'excitation $380 \pm 20 \text{ nm}$, d'émission $650 \pm 20 \text{ nm}$ avec un temps de délai de 30 μs avec un gain fixe à 135.

2.5 Analyse de la respiration mitochondriale

Le protocole utilisé est modifié de Monpays et al., (2016). Tous les *triplicata* ont été analysés individuellement.

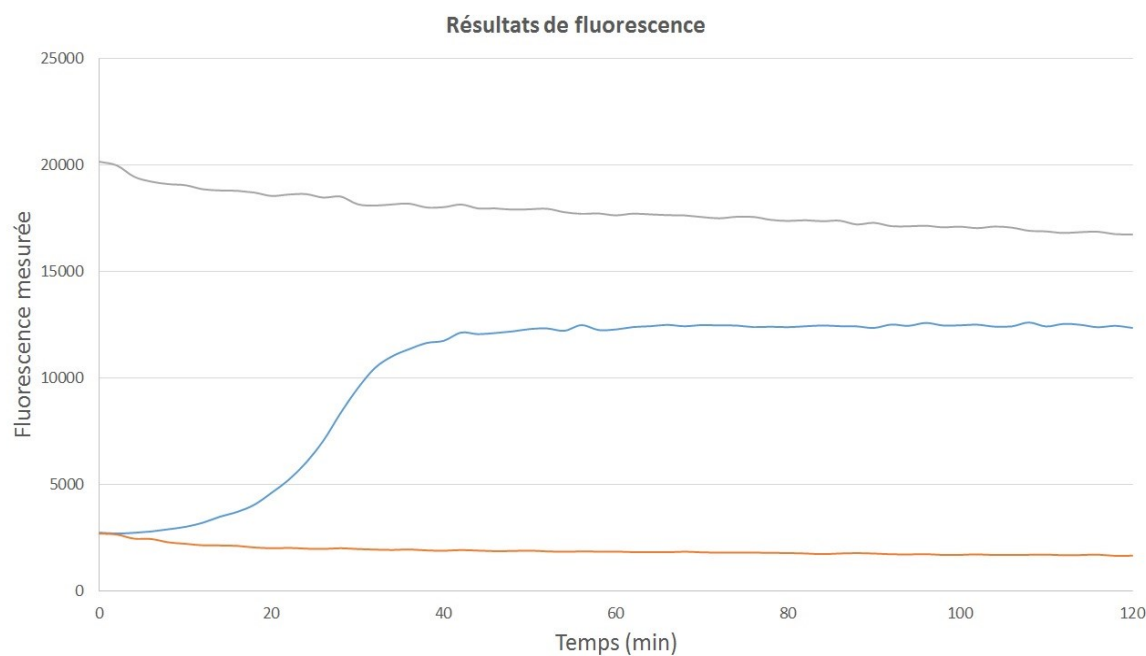


Figure 16 : Résultats bruts de la respiration mitochondriale. Courbe grise : Glucose oxydase où tout l'oxygène est consommé ; Courbe orange : contrôle négatif sans mitochondrie où l'oxygène empêche la sonde d'émettre sa fluorescence par *quenching* ; courbe bleue : résultats bruts d'une *triplicata* de la co-activation du complexe I et II.

La fluorescence (Figure 16) a été convertie en concentration d'O₂ (Figure 17) en fonction du temps par la formule ci-dessous.

$$[O_2]_{(t)} = \frac{(235I_a \times (I_0 - I_t))}{(I_t \times (I_0 - I_a))}$$

I_a représente la moyenne de la fluorescence sans mitochondrie obtenue entre 40 et 80 minutes (courbe orange Figure 16). I_0 représente la fluorescence maximale obtenue avec la moyenne de la fluorescence de glucose oxydase entre 100 et 120 minutes (courbe grise Figure 16). I_t représente la fluorescence obtenue pour chaque échantillon au temps t (courbe bleue Figure 16). 235 représente la concentration (μM) d'O₂ dans l'eau soit une saturation de 7,52 mg.L⁻¹.

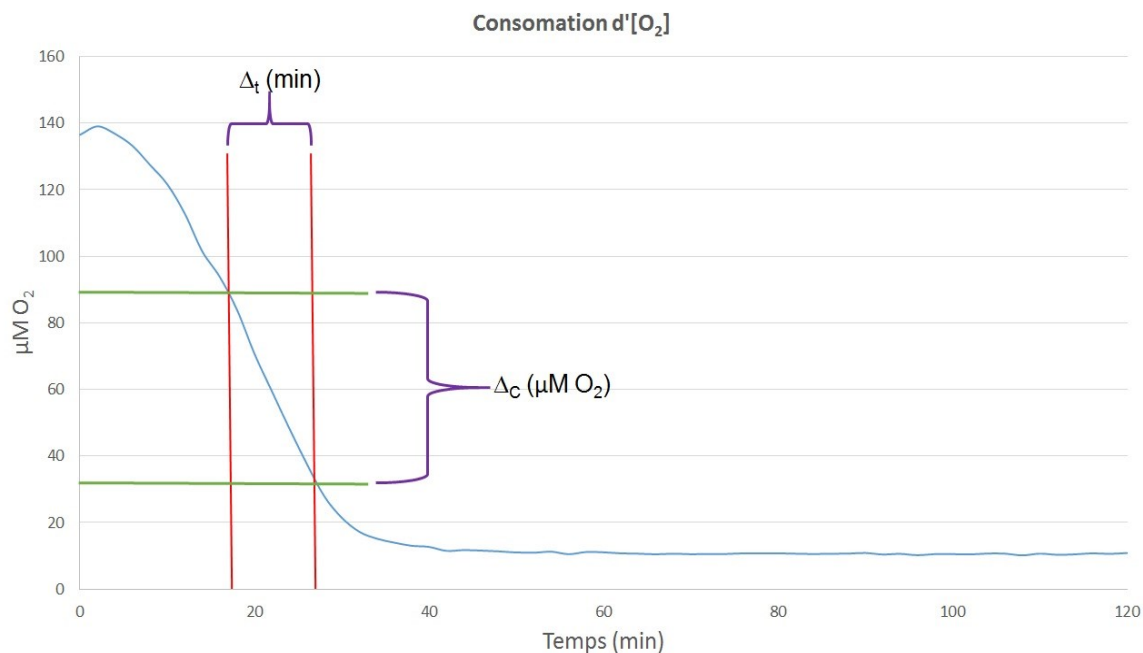


Figure 17 : Conversion de la fluorescence en consommation d'O₂. Courbe bleue : consommation d'O₂ en μM en fonction du temps ; Droite rouge : définit l'intervalle de temps en minute pour analyser tous les résultats d'une plaque pour cette condition ; Droite verte : définit les concentrations d'O₂ au temps t définie par les droites rouges.

La pente a été déterminée sur les mêmes intervalles de temps ensuite, la pente a été utilisée pour convertir la concentration par la formule suivante :

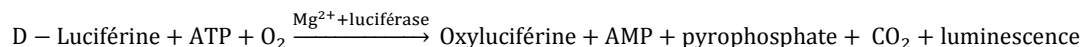
$$\text{activité respiratoire} = \frac{\Delta[O_2]_{(t)} \times 2.10^{-4}}{\Delta t} \times 40$$

40 est le facteur multiplicateur pour convertir en mg de protéines. Δt est la différence de temps. $\Delta[O_2]_{(t)}$ est la différence de concentration d'O₂ définie sur le même intervalle de temps. 2.10^{-4} est le facteur de volume du puits. L'activité respiratoire est exprimée en nmol d'O₂/mg de protéines/min.

La moyenne de ces trois résultats a été gardée comme valeur moyenne de l'activité respiratoire pour chaque échantillon et condition.

2.6 Mesure de la production d'ATP

Les protéines mitochondriales ont été diluées à une concentration de 65 µg/mL dans du tampon de respiration fraîchement préparé. La production d'ATP a été étudiée par le kit ATP-Determination-Kit, 200-1,000 assays (A22066 (Thermo Fisher Scientific, CA, USA)).



La sonde D-Luciférine a été reconstituée dans 1.0 mL de H₂O_{dd}. 500 µL de la sonde reconstituée a été dilué dans 9.5 mL de tampon de respiration puis homogénéisés. 2.5 µL de la luciole luciférase ont été ajoutés aux 10 mL de sonde préparés puis, l'ensemble est délicatement homogénéisé pour éviter toute dénaturation de la luciole luciférase. Une gamme étalon d'ATP a été utilisée par 100 µL d'ATP diluée aux concentrations 0.0000, 0.0026, 0.0050, 0.0100, 0.0150, 0.0176 et 0.0200 µmol par puits. Les substrats 1, 2, 3 et 4 précédemment décrits dans la partie « mesure de la respiration mitochondriale » ont été utilisés. Chacun des *triplicata* a été réalisé avec 3.25 µg de protéines mitochondriales par puits contenu dans 50 µL de tampon de respiration frais, 50 µL de substrats 1, 2, 3 et 4 et 100 µL de sonde. Les *triplicata* contrôles négatifs ont été réalisés à raison de 100 µL de substrats et de 100 µL de sonde. La gamme étalon a été réalisée en *duplicata* et contenait 100 µL de sonde et 100 µL d'ATP dilué. Un point important est que la sonde a été placée en dernier dans les puits et plus particulièrement dans les puits de la gamme étalon. La plaque a été placée immédiatement dans le lecteur de plaque GENios Pro (Tecan) précédemment préchauffé à 30 °C

pour une lecture en cinétique avec un intervalle de 60 sec entre chaque lecture pour une durée de 2 h. Le protocole de luminescence inclut un mouvement oscillant de la plaque afin d'homogénéiser les puits. Le temps d'intégration a été fixé à 300 ms.

2.7 Analyse de la production d'ATP

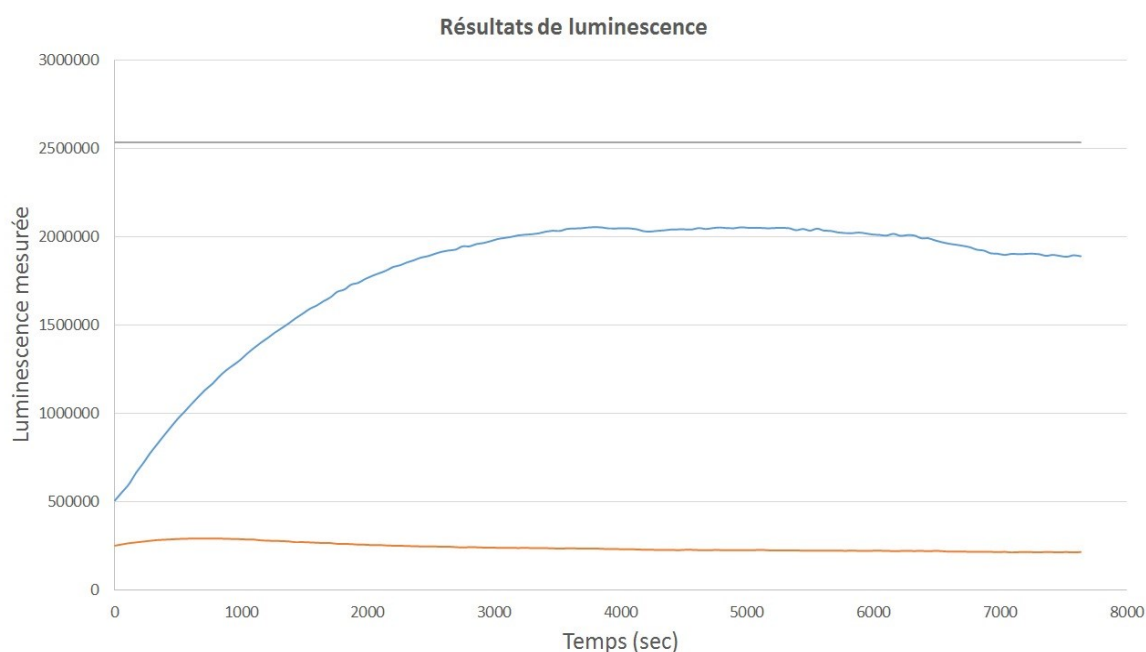


Figure 18 : Résultats bruts de la production d'ATP. Courbe grise : limite de luminescence de la gamme définie par le puits 0,015 μmol de la gamme étalon ; Courbe orange : contrôle négatif sans mitochondrie où il n'y a pas d'ATP produit ; Courbe bleue : résultats bruts d'un *triplicata* de la production d'ATP lors de la co-activation du complexe I et II.

Chaque échantillon a été analysé en dessous des 0.015 μmol (droite grise représente le seuil limite d'analyse de la plaque Figure 18). La moyenne entre 100 à 120 min des *triplicata* du contrôle négatif (courbe orange Figure 18) a été soustraite à chaque valeur de luminescence mesurée (courbe bleue Figure 18). Chaque valeur de luminescence a été convertie en μmol d'ATP en fonction du temps à l'aide d'une gamme standard qui a été établie à la première lecture de plaque (Figure 19). La

pente de la courbe ($R^2 \geq 0.94$) a été utilisée pour convertir la luminescence mesurée en quantité d'ATP.

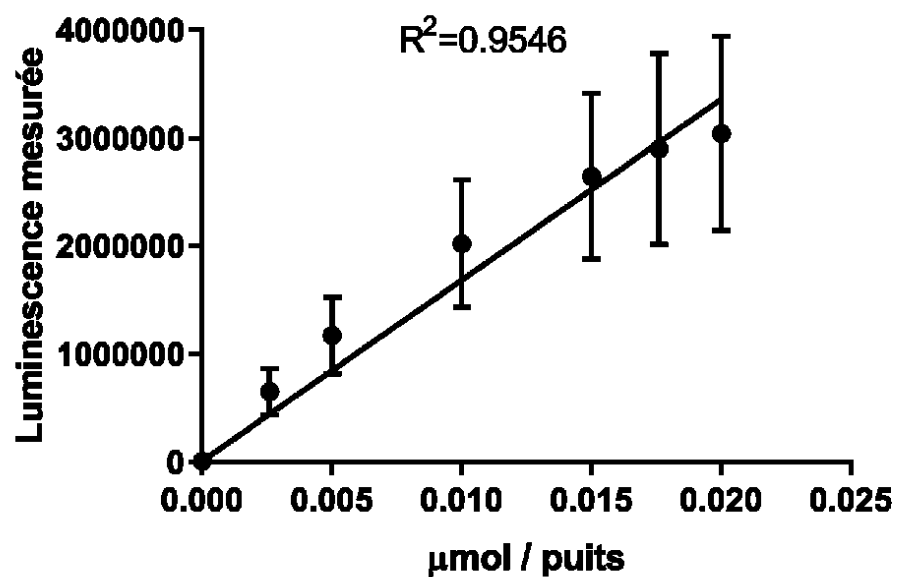


Figure 19 : Résultats de 49 gammes étalons.

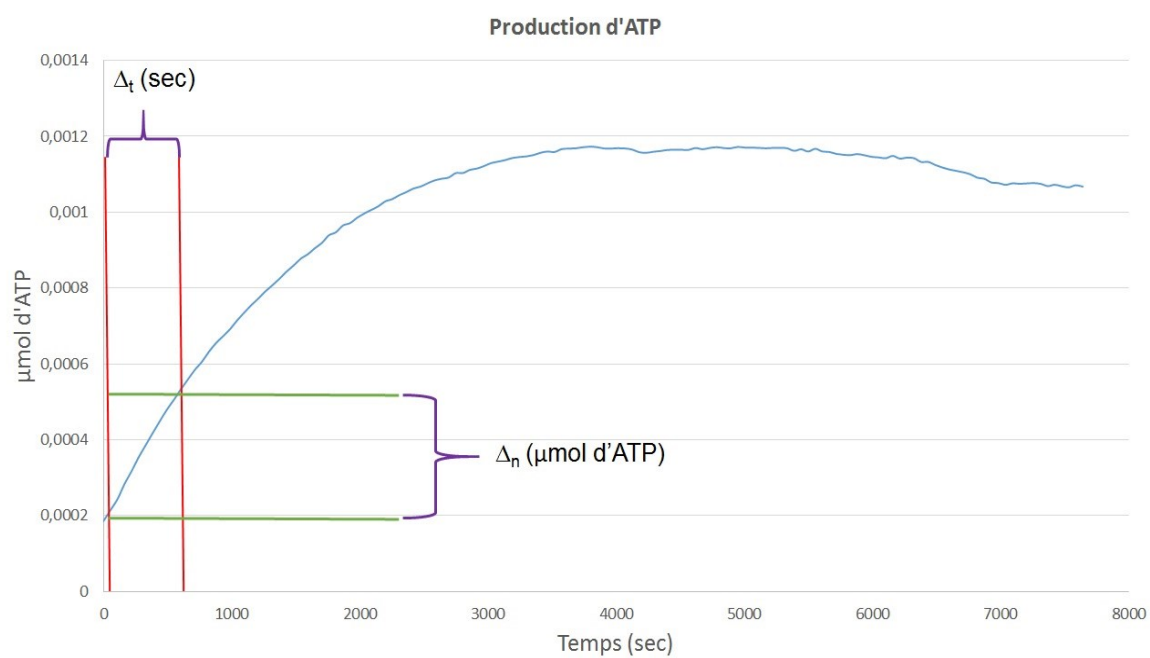


Figure 20 : Conversion de la luminescence en production d'ATP Courbe bleue : production d'ATP en μmol en fonction du temps ; Droite rouge : définie l'intervalle de temps en secondes pour analyser tous les résultats d'une plaque pour cette condition ; Droite verte : définie les quantités d'ATP au temps t définie par les droites rouges.

Le même intervalle de temps (Figure 20) a été utilisé pour déterminer la courbe de quantité d'ATP dans chaque puits et ainsi grâce à la formule ci-dessous en déduire la production d'ATP en nmol / mg de protéines / min.

$$\text{production d'ATP} = \left(\frac{\Delta_n}{\Delta_t} \times 60 \times 307.692308 \right) \times 10^3$$

Δ_t est la différence de temps. Δ_n est la différence de quantité d'ATP en μmol définie sur les mêmes différences de temps (Δ_t). 60 est le facteur de conversion de la production d'ATP en minute. 307.692308 est le facteur de conversion pour convertir la quantité de protéines mitochondriales contenue dans un puits en mg de protéines. 10^3 est le facteur de conversion pour convertir les μmol en nmol d'ATP. La production d'ATP a été exprimée en nmol/mg de protéines/min.

2.8 Western Blot

Pour les buvardages de type Western, les mitochondries isolées et utilisées pour les manipulations précédentes ont été réutilisées ici sans dénaturation thermique à raison de $20 \mu\text{g}$ par puits. Les échantillons ont ensuite été soumis à un gel polyacrylamide d'électrophorèse utilisant du sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE) (10 %). La migration a été effectuée durant 90 min à 120 V. Les gels ont ensuite été transférés sur une membrane de polyvinylidene fluoride (PVDF) (Immobilon-P IPVH00010) durant 120 min à 200 mA par membrane. Les membranes obtenues ont été

bloquées dans du lait dissous à 5 % (m/v) dans du TBST (NaCl 5 M 3.0 % ; Tween-20 0.2 % ; et du Tris-HCl pH 7.4 2,0 %) durant 2 h à température ambiante. Les membranes ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires à 4 °C durant toute la nuit. Les anticorps utilisés sont des anticorps primaires polyclonaux de chèvre anti-COX4I1 & COX4I2 (GTX88987) (1 : 1,000) (Genetex, Inc., CA, USA) ; cocktail d'anticorps anti-OXPHOS de souris (ab110413) (1 : 4,000) (Abcam Inc., MA, USA) deux points capitaux en utilisant ce cocktail d'anticorps étant qu'il ne faut faire aucune dénaturation thermique des échantillons ni de stripping avant de révéler la membrane (Konovalova, 2019), ces points ont été confirmés lors des tests préliminaires (différents tests ont permis de valider ces points (test sur différentes membranes et sur la même membrane en utilisant les mêmes échantillons dénaturés thermiquement et non dénaturés) voir la figure 21 ; de lapins, anticorps anti-UCP2 et anti-UCP4 (respectivement (NB100-78377) (1 : 1,000) (Novus Biologicals Inc., ON, CA) ; (GTX128022) (1 : 1,000) (Genetex, Inc., CA, USA)). Tous les anticorps primaires ont été dilués dans 5 % de lait (m/v) dans du TBST. Le jour suivant, les membranes ont ensuite été lavées à trois reprises avec du TBST puis incubées avec les anticorps secondaires dilués également dans du lait 5 % (m/v) dissout dans le TBST durant 2 h à température ambiante. Les anticorps secondaires sont des anticorps anti-chèvre provenant de l'âne IgG-HRP (sc-2020) (1 : 5,000) (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA) ; anti-souris m-IgGκ BP-HRP (sc-516102) (1 : 5,000) (Santa Cruz Biotechnology Inc., TX, USA) ; anti-lapin IgG-HRP (sc-2030) (1 : 5,000) (Santa Cruz Biotechnology Inc., TX, USA). Les membranes ont ensuite été lavées à trois reprises par du TBST durant 10 min par lavage puis elles ont été révélées (Fusion Pulse de Vilber Lourmat avec le logiciel Evolution Capt) en utilisant du Western Lightning plus (NEL103001EA) (FroggaBio Inc., ON, CA). Le logiciel ImageJ provenant du site du NIH a été utilisé pour mesurer la densité de bandes. Les résultats ont été normalisés par rapport aux résultats des COX4I1 & COX4I2.

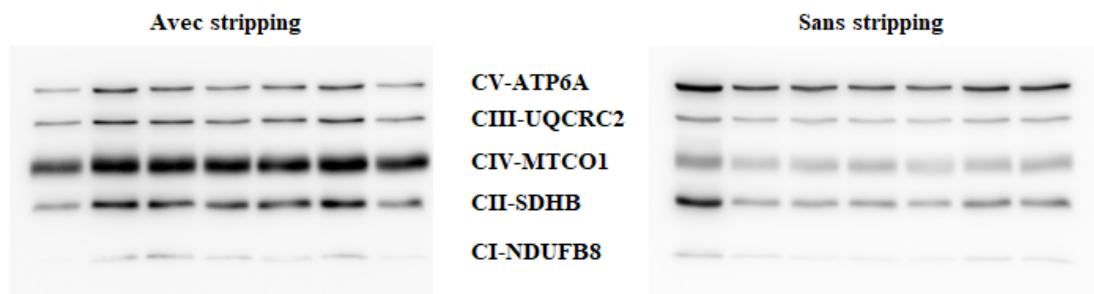


Figure 21 : Membranes d'immunobuvardages avec et sans stripping des complexes OXPHOS de protéines mitochondriales de PFC de souris femelles à 20 µg de protéines par puits sans dénaturation thermique.

2.9 Analyses statistiques

Les graphiques et toutes les statistiques ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism version 7.01. L'identification des valeurs aberrantes fut réalisée par un test Grubbs avec un risque alpha de 5 %. Tous les résultats sont présentés en utilisant la moyenne \pm DS (déviatoin standard). L'analyse statistique des résultats des souris mâles et femelles est une analyse de variance (ANOVA) paramétrique à deux facteurs :

- Une ANOVA a été réalisée afin de comparer condition x traitement. Voir le tableau 3 pour voir les conditions et les traitements utilisés pour l'ANOVA.

		Condition	
		Contrôle (Saline sans SC)	THMs (PIC+SC) (de l'anglais two-hit model of schizophrenia)
traitement	Saline	Contrôle + Saline	THMs + Saline
	1-MT	Contrôle + 1-MT	THMs + 1-MT

Tableau 3 : Répartition des conditions en fonction des traitements

- Une autre ANOVA a été réalisée afin de comparer sexe x traitement (au sein de la même condition (THMs ou contrôle)).

Les corrections statistiques utilisées dans l'ensemble des statistiques seront des corrections Bonferroni et les résultats des analyses statistiques ont été définis comme significatifs à $P \leq 0.05$.

3. Résultats

3.1 Activité mitochondriale et dimorphisme sexuel

3.1.1 Complexe I

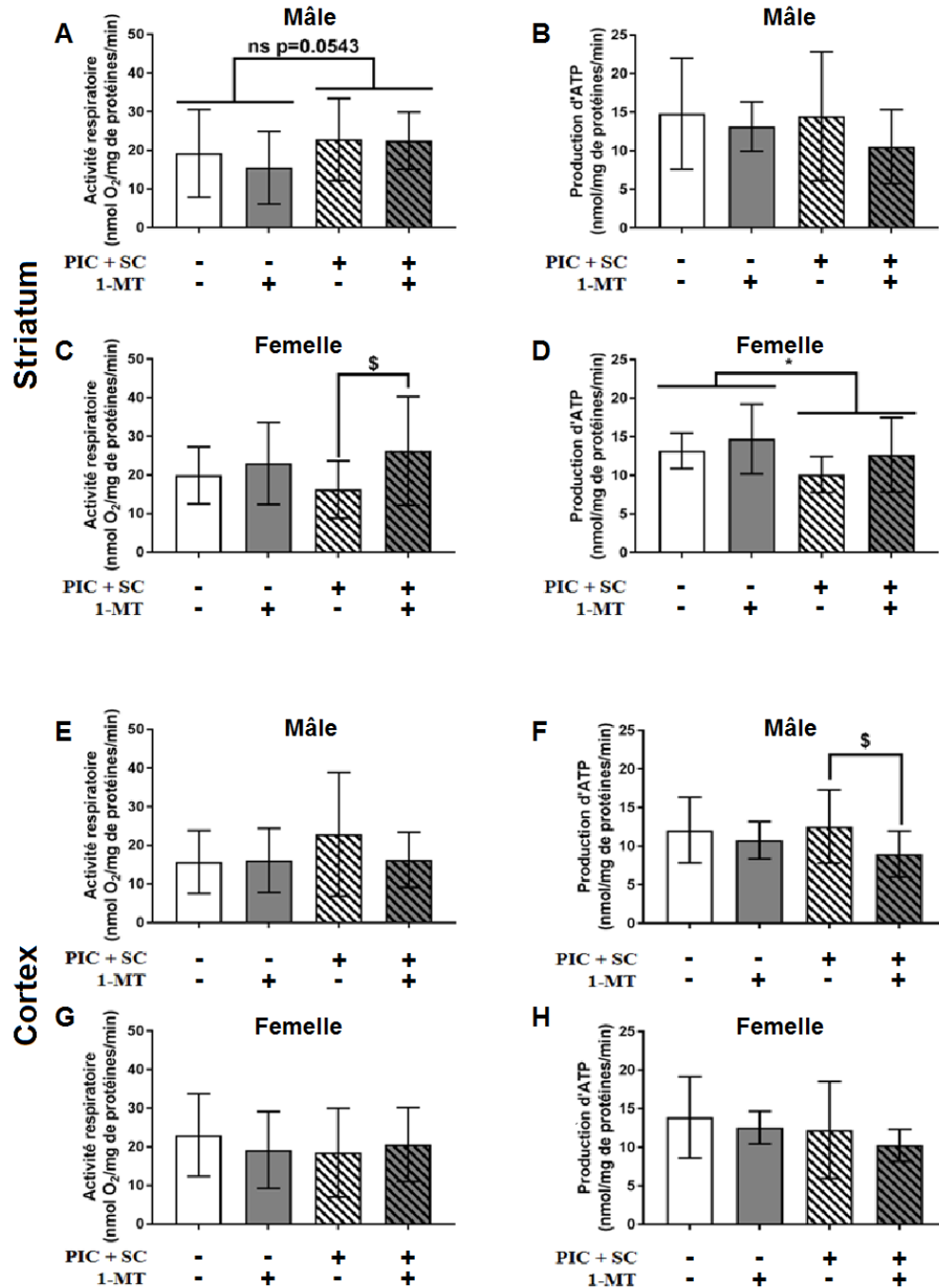


Figure 22 : L'activité respiratoire induite du complexe I (nmol O₂/mg de protéines/min) et la production d'ATP (nmol/mg de protéines/min) dans le striatum (A, B, C et D) et dans le cortex (E, F, G et H). L'activité du complexe I est explorée avec le substrat (1) décrit dans la partie matériel et

méthode « Mesure de la respiration mitochondriale ». Les résultats des souris mâles (A, B, E et F) et des femelles (C, D, G et H) présentent l'activité respiratoire (A, C, E et G) et la production d'ATP (B, D, F et H). Les résultats sont analysés par un ANOVA two-way (condition x traitement (1-MT)) et sont présentés en moyenne \pm la déviation standard. * $p < 0.05$ compare le modèle (THMs soit PIC + SC) comparativement aux contrôles indépendamment des traitements, \$ $p < 0.05$ compare le THMs traité 1-MT par rapport au THMs traité véhicule (mâles $n=13-14$; femelles $n=10-13$).

L'analyse des résultats de l'activité mitochondriale du complexe I par un ANOVA two-way montre une tendance à l'augmentation de l'activité respiratoire pour le THMs (PIC + SC) comparativement aux souris contrôles ($F_{1,49} = 3.888$; $P = 0.0543$ (Figure 22A)). Les analyses des résultats dans le striatum des souris femelles THMs ont été effectuées par un ANOVA two-way et ont révélé une augmentation de la respiration en réponse au traitement 1-MT indépendamment de la condition ($F_{1,44} = 4.741$; $P < 0.05$ (Figure 22C)). De plus, les résultats post-hoc de Bonferroni ont révélé une augmentation de l'activité respiratoire dans le striatum des souris THMs femelles traitées au 1-MT comparativement aux souris traitées par le véhicule (+62 % ; $P < 0.05$ (Figure 22C)). Les analyses des résultats dans le striatum des souris femelles THMs ont été effectuées par un ANOVA two-way et ont révélé une diminution de la production d'ATP comparativement aux groupes contrôles, et ce, indépendamment du traitement 1-MT ($F_{1,42} = 5.143$; $P < 0.05$ (Figure 22D)). Chez les souris mâles, le traitement 1-MT provoque une diminution significative, indépendamment de la condition de la production d'ATP dans le PFC des souris mâles THMs et contrôles ($F_{1,49} = 5.649$; $P < 0.05$ (Figure 22F)), et les résultats post-hoc de Bonferroni démontrent une diminution significative de la production d'ATP dans le PFC des souris mâles THMs traitées au 1-MT comparativement aux souris THMs traitées au véhicule (-28 % ; $P < 0.05$ (Figure 22F)).

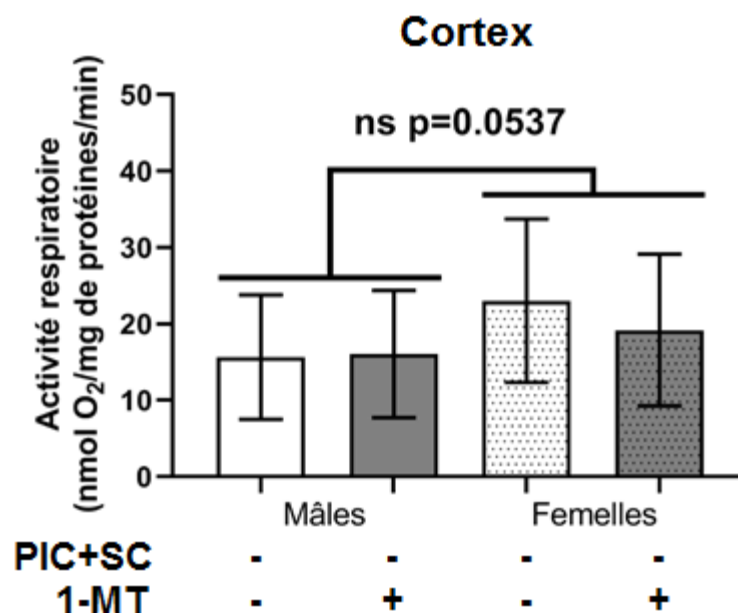


Figure 23 : Dimorphisme sexuel de l'activité respiratoire induite du complexe I (nmol O₂/mg de protéines/min) dans le cortex. L'activité du complexe I est explorée avec le substrat (1) décrit dans la partie matériel et méthode « Mesure de la respiration mitochondriale ». Les résultats des souris mâles et des femelles contrôles présentent le dimorphisme sexuel de l'activité respiratoire. Les résultats sont analysés par un ANOVA two-way (sexe x traitement dans la condition contrôle) et sont présentés en moyenne \pm la déviation standard. (mâles n=12-14 ; femelles n=11-13).

Un ANOVA Two-way (sexe x traitement (dans la condition contrôle) démontre une tendance des souris femelles contrôles au niveau de PFC à présenter une activité respiratoire supérieure aux souris mâles contrôles ($F_{1,45} = 3.927$; $P = 0.0537$).

En résumé :

- Dans le striatum des souris mâles, le modèle présente donc une tendance à l'augmentation de la respiration.
- Dans le striatum des souris femelles, une augmentation de la respiration dans le modèle est observée en réponse au 1-MT avec un effet du modèle à diminuer la production d'ATP indépendamment du traitement.

- Dans le cortex des souris mâles seule la production d'ATP est diminuée en réponse au traitement du 1-MT et plus particulièrement dans le modèle.
- Une réponse sexuelle dimorphique est observée dans la respiration du cortex entre les souris contrôles mâles et femelles.

Un constat est observable qu'il y a de nombreuses réponses qui semblent être spécifiques à la région neuroanatomique et au sexe. Un autre phénomène intéressant est que la respiration liée au complexe I est dérégulée dans le striatum quel que soit le sexe, alors que la production d'ATP est modifiée dans le cortex pour les souris mâles et le striatum pour les souris femelles.

3.1.2 Complexe II

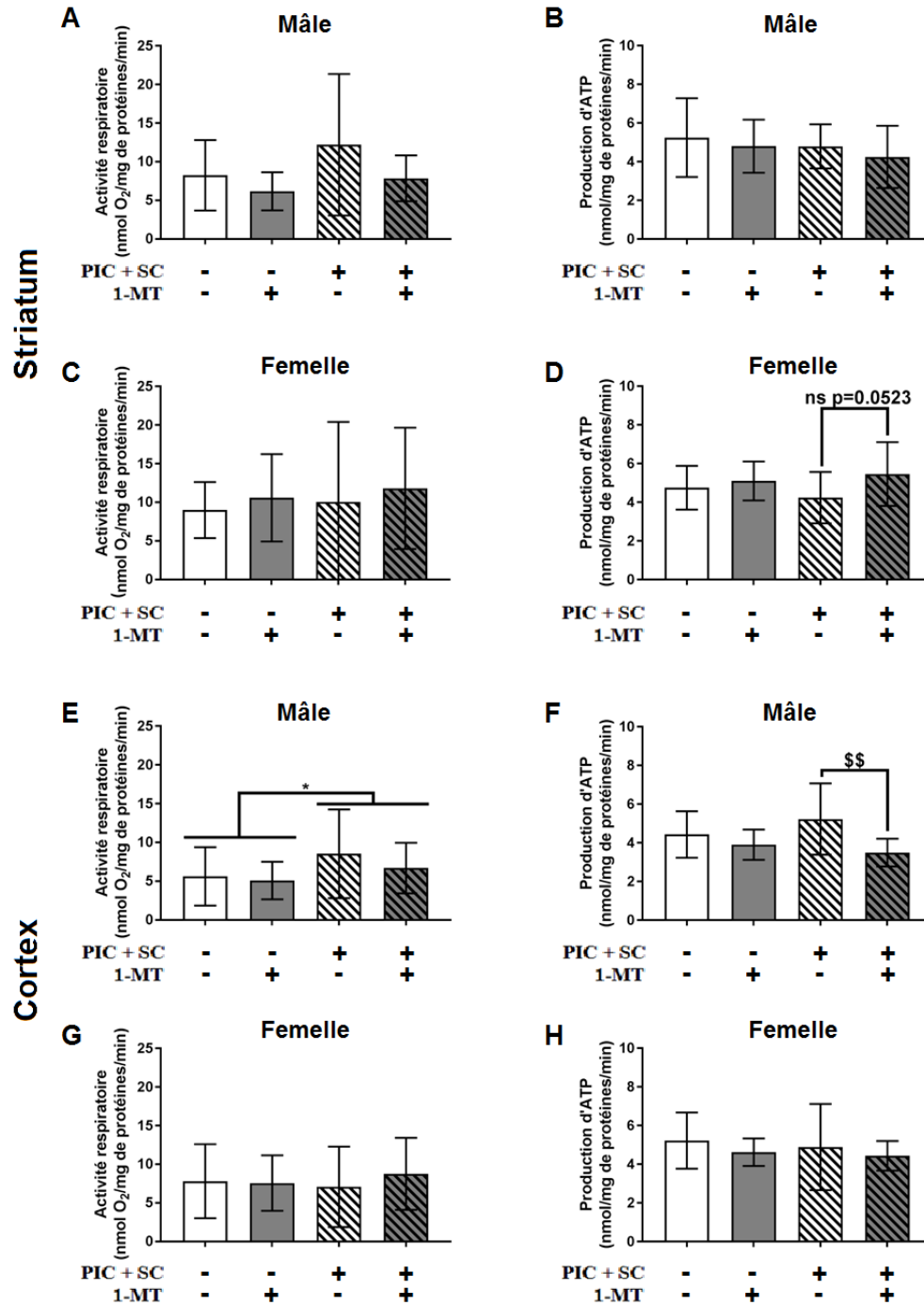


Figure 24 : L'activité respiratoire induite du complexe II (nmol O₂/mg de protéines/min) et la production d'ATP (nmol/mg de protéines/min) dans le striatum (A, B, C et D) et dans le cortex (E, F, G et H). L'activité du complexe II est explorée avec le substrat (3) décrit dans la partie matériel et méthode « Mesure de la respiration mitochondriale ». Les résultats des souris mâles (A, B, E et F) et des femelles (C, D, G et H) présente l'activité respiratoire (A, C, E et G) et la production d'ATP (B, D, F et H). Les résultats sont analysés par un ANOVA two-way (condition x traitement (1-MT)) et sont présentés en moyenne \pm la déviation standard. * $p < 0.05$ compare les THMs

comparativement aux contrôles indépendamment des traitements, \$\$ $p < 0.01$ compare le THMs traité 1-MT par rapport au THMs non traité (mâles $n=12-14$; femelles $n=11-13$).

L'analyse des résultats de l'activité respiratoire par un ANOVA Two-way (condition x traitement) démontre un effet global du 1-MT observé dans le striatum des souris mâles, qui diminue la respiration indépendamment de la condition ($F_{1,45} = 4.35$; $P < 0.05$ (Figure 24A)). Le traitement 1-MT induit une augmentation significative de la production d'ATP dans le striatum des souris femelles ($F_{1,43} = 4.088$; $P < 0.05$ (Figure 24D)) et les résultats post-hoc de Bonferroni suggèrent une tendance à l'augmentation spécifiquement dans le groupe THMs en réponse au traitement 1-MT (+29 % ; $P = 0.0523$ (Figure 24D)). L'analyse des résultats par un ANOVA Two-way (condition x traitement) de l'activité respiratoire induite du complexe II dans le PFC des souris THMs mâles comparativement aux souris contrôles révèle une augmentation de la respiration, indiquant un effet du THMs indépendamment du traitement ($F_{1,48} = 4.287$; $P < 0.05$ (Figure 24E)). Dans les PFC des souris mâles THMs et contrôles, le traitement 1-MT provoque une diminution globale et significative de la production d'ATP indépendamment de la condition ($F_{1,47} = 10.77$; $P < 0.01$ (Figure 24F)). De plus, le résultat post-hoc de Bonferroni montre un effet significatif du traitement 1-MT à diminuer la production d'ATP dans le PFC des souris mâles THMs (-33 % ; $P < 0.01$ (Figure 24F)).

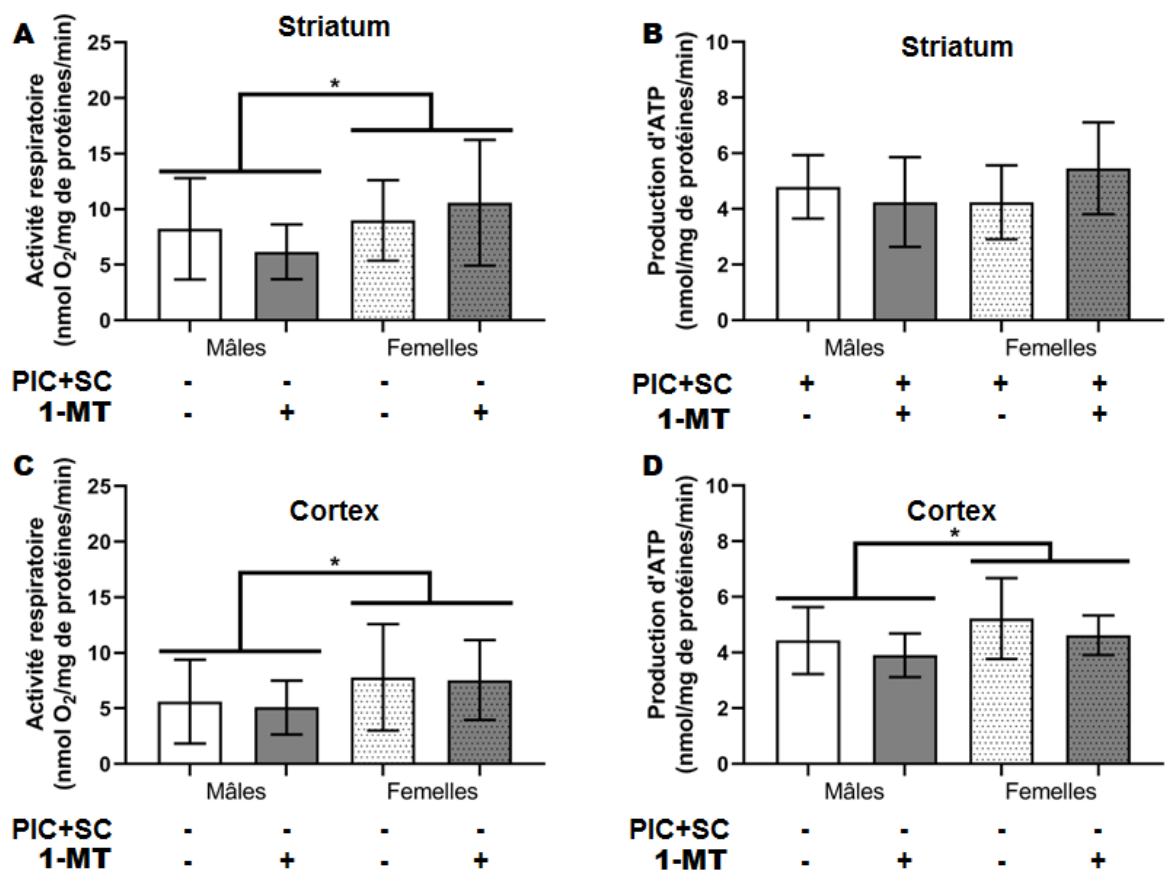


Figure 25 : Dimorphisme sexuel de l'activité respiratoire induite du complexe II (nmol O₂/mg de protéines/min) et de la production d'ATP (nmol/mg de protéines/min) dans le striatum (A et B) et le cortex (C et D). L'activité du complexe II est explorée avec le substrat (3) décrit dans la partie matériel et méthode « Mesure de la respiration mitochondriale ». Les résultats des souris mâles et des femelles présentent le dimorphisme sexuel de l'activité respiratoire. Les résultats sont analysés par un ANOVA two-way (sexe x traitement dans la condition contrôle) et sont présentés en moyenne \pm la déviation standard. * $p < 0.05$ compare les mâles contrôles comparativement aux femelles contrôles indépendamment du traitement 1-MT (mâles $n=12-14$; femelles $n=11-13$).

De façon très intéressante, un ANOVA Two-way (sexe x traitement (au sein du contrôle)) démontre une augmentation significative de l'activité respiratoire dans le striatum des souris femelles par rapport aux souris mâles ($F_{1,46} = 4.477$; $P < 0.05$ (Figure 25A)). De plus, une interaction est montrée dans le striatum lors de la production d'ATP entre le traitement 1-MT et le sexe des souris THMs ($F_{1,46} = 4.489$; $P < 0.05$ (Figure 25B)). De façon similaire, l'ANOVA Two-way (sexe x traitement (au sein du contrôle)) démontre un dimorphisme sexuel dans le PFC par

une différence de l'activité respiratoire entre les souris contrôles femelles, qui est plus élevée comparativement aux contrôles mâles ($F_{1,45} = 4.852$; $P < 0.05$ (Figure 25C)) et de la production d'ATP ($F_{1,44} = 5.896$; $P < 0.05$ (Figure 25D)).

La diminution de la réponse respiratoire dans le striatum des souris mâles causée par le traitement 1-MT indépendamment de la condition semble plus être causée par la variabilité élevée du THMs x véhicule qui est retrouvée également chez les femelles. Cependant, une tendance à la hausse de la production d'ATP est observable en réponse au 1-MT dans le striatum des souris femelles THMs. À l'opposé, l'hyper variabilité de l'activité respiratoire du modèle ne se retrouve pas dans le cortex où est observée une augmentation de la respiration des souris mâles du modèle comparativement aux contrôles et où une diminution significative de la production d'ATP est notable dans le modèle en réponse au 1-MT. De nombreux dimorphismes sexuels sont présents ici, les femelles présentent à la fois une activité respiratoire et une production d'ATP plus importantes que chez les mâles.

Pour résumer :

Les effets notés dans l'étude des complexes I et II séparés, il semble que :

- L'activité du complexe I semble plus affectée dans le striatum.
- L'activité du complexe II semble plus affectée dans le cortex préfrontal.

3.1.3 Co-activation des complexes I et II

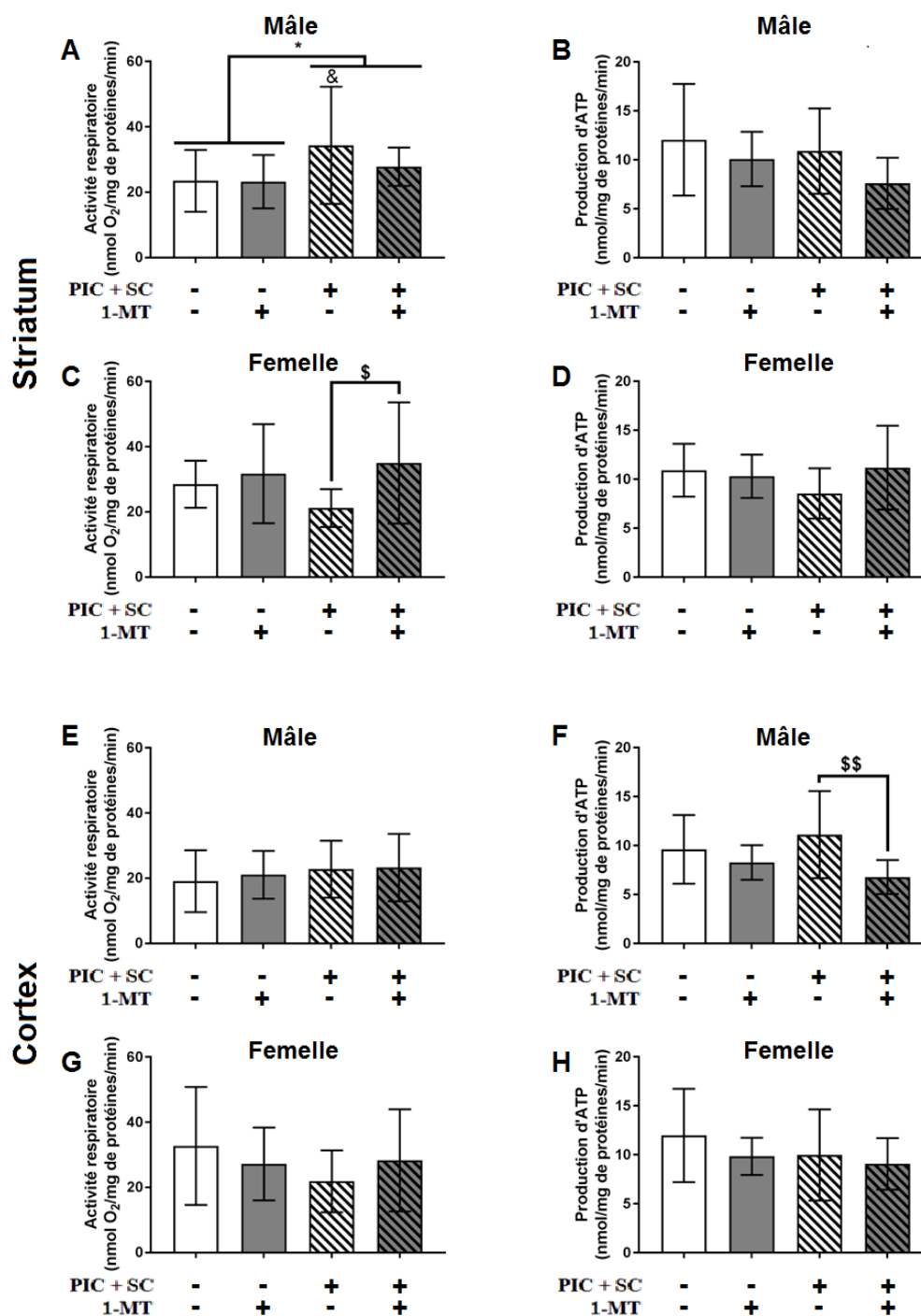


Figure 26 : L'activité respiratoire induite par la co-activation des complexes I et II (nmol O₂/mg de protéines/min) et la production d'ATP (nmol/mg de protéines/min) dans le striatum (A, B, C et D) et dans le cortex (E, F, G et H). L'activité des complexes I et II est explorée avec le substrat (4) décrit dans la partie matériel et méthode « Mesure de la respiration mitochondriale ». Les résultats des souris mâles (A, B, E et F) et des femelles (C, D, G et H) présentent l'activité respiratoire (A, C, E et G) et la production d'ATP (B, D, F et H). Les résultats sont analysés par un ANOVA two-

way (condition x traitement (1-MT)) et sont présentés en moyenne \pm déviation standard. * $p < 0.05$ compare le modèle (THMs) comparativement aux contrôles indépendamment des traitements, \$ $p < 0.05$ et \$\$ $p < 0.01$ compare le THMs traité par rapport au THMs non traité, & $p < 0.05$ compare le groupe contrôle traité au véhicule au groupe THMs x véhicule (mâles $n=11-14$; femelles $n=10-13$).

L'analyse par un ANOVA Two-way des résultats de l'activité respiratoire induite de la co-activation des complexes I et II dans le striatum des souris mâles démontre une augmentation significative, indépendamment du traitement, de la respiration du THMs comparativement aux groupes contrôles ($F_{1,49} = 6.277$; $P < 0.05$ (Figure 26A)). De plus, les résultats post-hoc de Bonferroni démontrent une augmentation significative entre les striatum des souris mâles THMs traitées véhicule comparativement aux souris contrôles traitées véhicule (+46 % ; $P < 0.05$ (Figure 26A)). Une diminution significative après le traitement 1-MT, indépendamment de la condition, est également observée dans le striatum des souris mâles pour la production d'ATP ($F_{1,46} = 5.187$; $P < 0.05$ (Figure 26B)). Chez les souris femelles, un ANOVA Two-way démontre une augmentation significative induite par le traitement 1-MT de l'activité respiratoire chez les contrôles et les THMs ($F_{1,43} = 4.860$; $P < 0.05$ (Figure 26C)) et les résultats post-hoc de Bonferroni démontrent une augmentation significative dans le striatum des souris femelles THMs traitées 1-MT comparativement aux souris THMs traitées véhicule (+65 % ; $P < 0.05$ (Figure 26C)). Dans le PFC des souris mâles, un ANOVA Two-way démontre une diminution de la production d'ATP en réponse au 1-MT ($F_{1,47} = 10.62$; $P < 0.01$ (Figure 26F)), et les résultats post-hoc de Bonferroni démontrent une diminution significative chez les souris mâles THMs en réponse au traitement 1-MT (-39 % ; $P < 0.01$ (Figure 26F)).

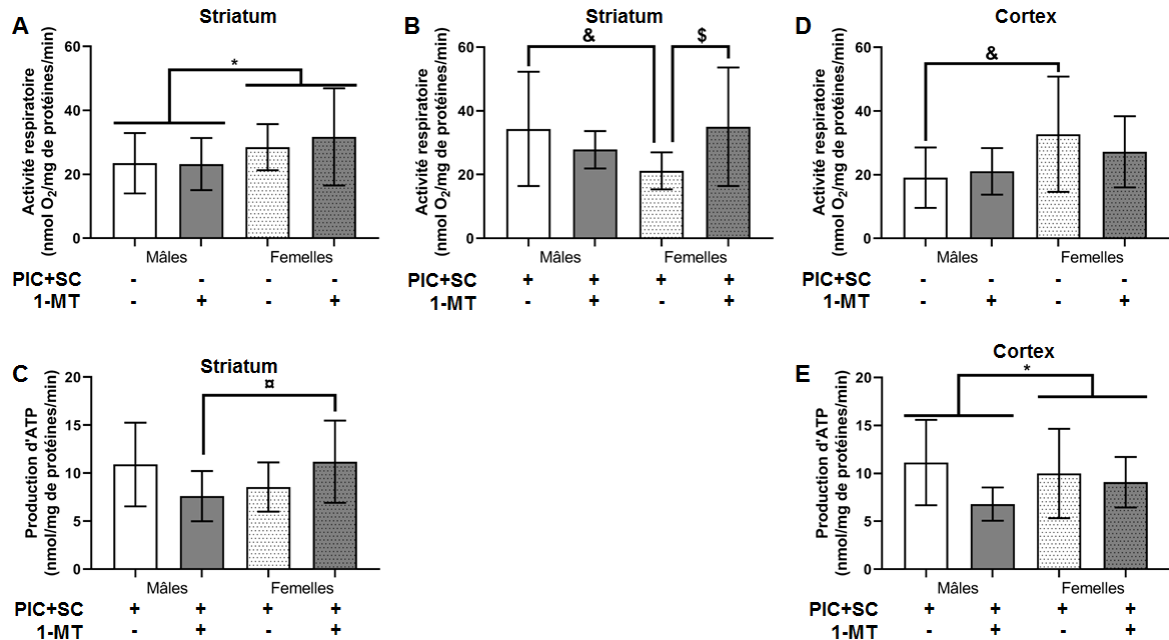


Figure 27 : Dimorphisme sexuel de l'activité respiratoire induite de la co-activation des complexes I et II (nmol O₂/mg de protéines/min) (A B et D) et de la production d'ATP (nmol/mg de protéines/min) (C et E) dans le striatum (A B et C) et le cortex (D et E). L'activité des complexes I et II est explorée avec le substrat (4) décrit dans la partie matériel et méthode « Mesure de la respiration mitochondriale ». Les résultats des souris mâles et des femelles présentent le dimorphisme sexuel de l'activité respiratoire. Les résultats sont analysés par un ANOVA two-way (sexe x traitement dans la condition contrôle) et sont présentés en moyenne \pm la déviation standard. * $p < 0.05$ compare les mâles contrôles comparativement aux femelles contrôles indépendamment du traitement 1-MT, \$ $p < 0.05$ compare le THMs traité par rapport aux THMs non traités, & $p < 0.05$ compare le groupe contrôle traité au véhicule au groupe THMs traité véhicule, \square $p < 0.05$ compare le groupe contrôle traité 1-MT au groupe THMs traité 1-MT (mâles $n=11-14$; femelles $n=10-13$).

Plusieurs dimorphismes sexuels importants sont à noter ici révélés par un ANOVA Two-way (sexe x traitement (au sein des contrôles ou THMs), tels qu'une différence significative de l'activité respiratoire des souris femelles contrôles qui présentent une activité respiratoire supérieure aux souris mâles contrôles dans le striatum ($F_{1,45} = 5.096$; $P < 0.05$ (Figure 27A)). De plus, une interaction est observable dans le striatum des souris THMs. En effet, le traitement semble diminuer l'activité respiratoire chez les mâles, alors qu'il semble l'augmenter chez les souris femelles THMs ($F_{1,47} = 7.028$; $P < 0.05$ (Figure 27B)). De façon très intéressante, cette interaction se complète par un résultat post-hoc de

Bonferroni montrant une diminution significative entre les souris femelles THMs traitées avec le véhicule comparativement aux souris mâles THMs traitées véhicule (-38 % ; $P < 0.05$ (Figure 27B)). Une autre interaction peut être observée dans le striatum entre les souris mâles et les souris femelles par un ANOVA Two-way (sexe x traitement (dans la condition THMs) soit une diminution significative de la production d'ATP chez les souris mâles traitées 1-MT avec une augmentation chez les souris femelles traitées 1-MT ($F_{1,46} = 8.613$; $P < 0.01$ (Figure 27C)). De plus, ce dimorphisme sexuel se complète par un résultat post-hoc de Bonferroni montrant une différence significative dans la production d'ATP entre les mâles THMs traité 1-MT et les femelles THMs traitées 1-MT qui produisent plus d'ATP que les mâles (+47 % $P < 0.05$ (Figure 27C)). L'analyse par un ANOVA Two-way dans le cortex des souris contrôles mâles et femelles traitées avec le véhicule présente une différence significative de l'activité respiratoire qui est plus importante chez les femelles ($F_{1,45} = 8.455$; $P < 0.01$ (Figure 27D)) et dont le post-hoc de Bonferroni indique une augmentation de l'activité respiratoire chez les souris femelles (+72 % ; $P < 0.05$ (Figure 27D)). Par ailleurs, la production d'ATP dans le cortex des souris femelles THMs est augmentée par rapport aux mâles souris THMs indépendamment du traitement ($F_{1,44} = 4.521$; $P < 0.05$ (Figure 27E)).

Les modifications de l'activité respiratoire liées à la co-activation des complexes I et II semblent affecter exclusivement le striatum. En effet, les souris mâles du modèle présentent une augmentation par rapport aux souris contrôles indépendamment du traitement, mais aussi le modèle traité véhicule comparativement aux souris contrôles véhicules. Il est également noté un effet du 1-MT dans le striatum des souris femelles THMs qui induit une augmentation de la respiration. Ici, le 1-MT ne semble avoir un effet que sur la production d'ATP des souris mâles aussi bien dans le striatum que dans le cortex. Les nombreux dimorphismes sexuels tendent à démontrer une réponse réellement différente entre les mâles et les femelles aussi bien chez les contrôles que dans le THMs.

3.1.4 Activité de fuite

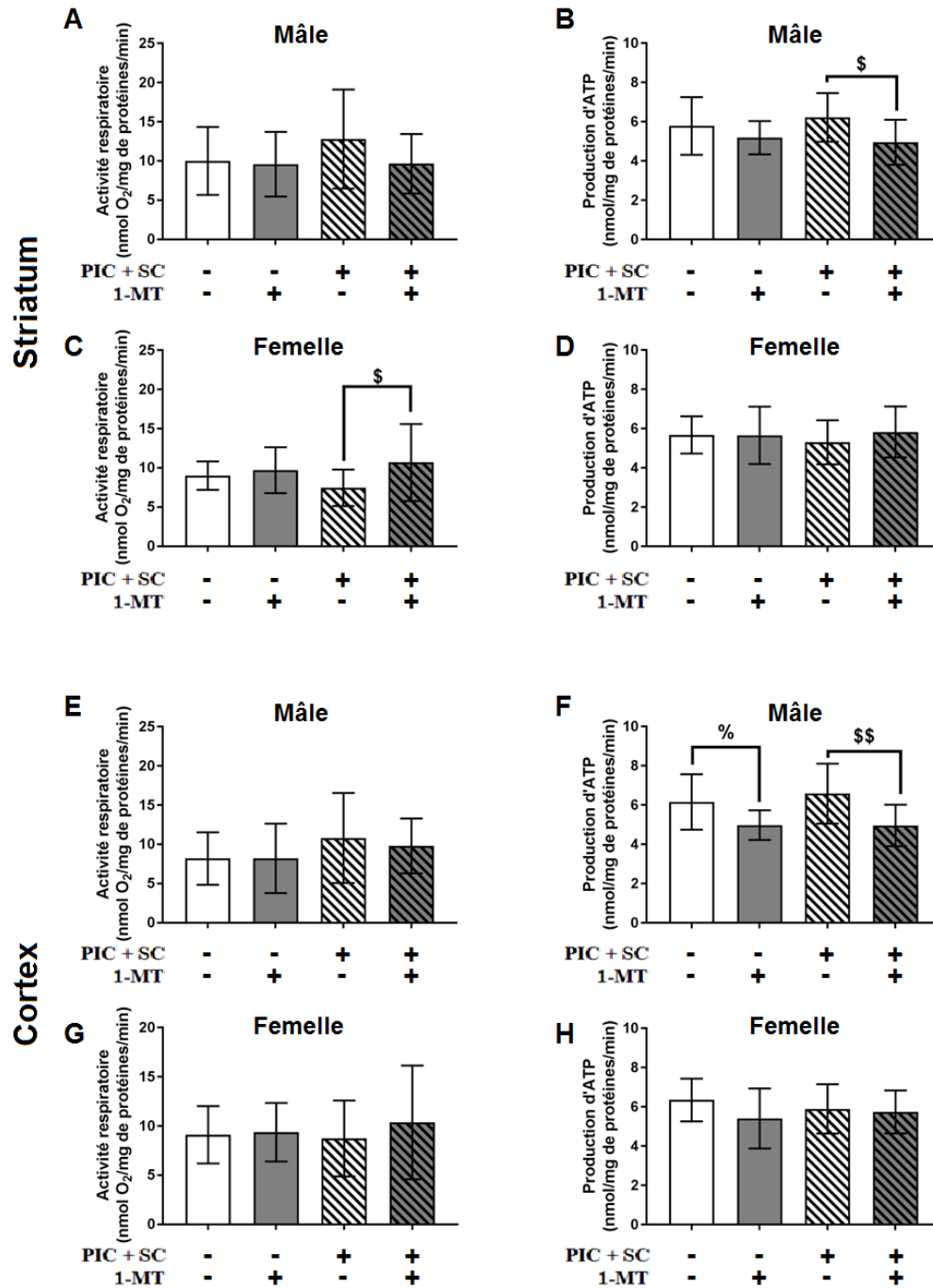


Figure 28 : L'activité respiratoire induite de l'activité de fuite (nmol O₂/mg de protéines/min) et la production d'ATP (nmol/mg de protéines/min) dans le striatum (A, B, C et D) et dans le cortex (E, F, G et H). L'activité de fuite est explorée avec le substrat (2) décrit dans la partie matériel et méthode « Mesure de la respiration mitochondriale ». Les résultats des souris mâles (A, B, E et F) et des femelles (C, D, G et H) présente l'activité respiratoire (A, C, E et G) et la production d'ATP (B, D, F et H). Les résultats sont analysés par un ANOVA two-way (condition x traitement (1-MT)) et sont présentés en moyenne \pm la déviation standard, \$ $p < 0.05$ et \$\$ $p < 0.01$ comparent

les THMs traités 1-MT par rapport aux THMs traités véhicule, % $p < 0.05$ compare le groupe contrôle traité au véhicule au groupe contrôle traité 1-MT (mâles $n=10-14$; femelles $n=10-13$).

L'analyse par un ANOVA Two-way des résultats de l'activité respiratoire de fuite induite démontre que le traitement 1-MT dans le striatum des souris mâles diminue la production d'ATP quelle que soit la condition ($F_{1,47} = 7.508$; $P < 0.01$ (Figure 28B)), avec un résultat post hoc de Bonferroni démontrant une diminution significative de la production d'ATP au sein des souris THMs traitées 1-MT comparativement à celles traitées véhicule (-20 % ; $P < 0.05$ (Figure 28B)). Dans le striatum des souris femelles THMs, l'ANOVA Two-way montre une augmentation significative de l'activité respiratoire en réponse au 1-MT indépendamment de la condition ($F_{1,43} = 4.162$; $P < 0.05$ (Figure 28C)) et plus particulièrement, le post-hoc de Bonferroni démontre une augmentation significative en réponse au 1-MT dans le striatum des souris femelles du THMs (+43 % ; $P < 0.05$ (Figure 28C)). Dans le PFC des souris mâles un ANOVA Two-way montre un effet du traitement 1-MT qui diminue la production d'ATP indépendamment de la condition ($F_{1,48} = 16.8$; $P < 0.01$ (Figure 28F)), et une analyse post-hoc de Bonferroni y a révélé une diminution significative dans les groupes contrôles et dans les groupes THMs traités 1-MT comparativement aux souris traitées véhicules (-19 % ; $P < 0.05$; -25 % $P < 0.01$ respectivement pour les groupes contrôles et THMs (Figure 28F)).

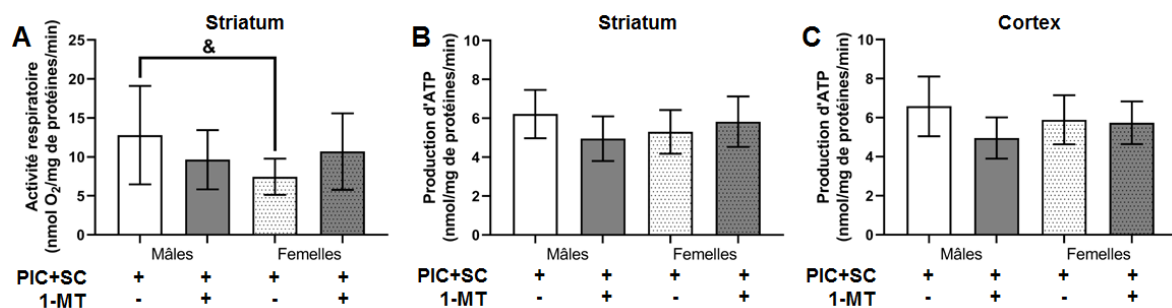


Figure 29 : Dimorphisme sexuel de l'activité respiratoire induite de l'activité de fuite (nmol O₂/mg de protéines/min) et de la production d'ATP (nmol/mg de protéines/min) dans le striatum (A et B)

et le cortex (C). L'activité de fuite est explorée avec le substrat (2) décrit dans la partie matériel et méthode « Mesure de la respiration mitochondriale ». Les résultats des souris mâles et des femelles présentent le dimorphisme sexuel de l'activité respiratoire (A) et de la production d'ATP (B et C). Les résultats sont analysés par un ANOVA two-way (sexe x traitement dans la condition contrôle) et sont présentés en moyenne \pm la déviation standard. & $p < 0.05$ compare le groupe contrôle traité au véhicule au groupe THMs traité au véhicule (mâles $n=10-14$; femelles $n=10-13$).

Un ANOVA Two-way (sexe x traitement (dans le groupe THMs)) montre une interaction dans le striatum des groupes THMs ($F_{1,47} = 6.004$; $P < 0.05$ (Figure 29A)). Un post-hoc de Bonferroni significatif chez les souris femelles THMs traitées véhicule indique une activité respiratoire diminuée comparativement aux souris mâles THMs traitées véhicule (-42 % ; $P < 0.05$ (Figure 29A)). Un ANOVA Two-way (sexe x traitement (dans le groupe THMs)) montre un dimorphisme sexuel concernant l'interaction entre le sexe et le traitement. En effet, dans le striatum des souris mâles THMs traitées au 1-MT, la production d'ATP est diminuée comparativement aux souris femelles traitées 1-MT ($F_{1,49} = 7.339$; $P < 0.01$ (Figure 29B)). Une interaction a également été révélée par une analyse ANOVA Two-way (sexe x traitement (dans le groupe THMs)) montrant une diminution de la production d'ATP dans le PFC des souris mâles, qui reste inchangée chez les souris femelles ($F_{1,45} = 4.215$; $P < 0.05$ (Figure 29C)).

Ici un effet intéressant est que la dérégulation de l'activité respiratoire lors de l'étude de l'activité de fuite ne touche que les femelles et la production d'ATP n'est affectée que chez les mâles. Cependant, le striatum des souris mâles THMs traitées véhicule présente une activité respiratoire de fuite plus importante que les souris femelles.

3.2 Dérégulation de l'expression protéique des complexes OXPHOS et des protéines découplantes (*Uncoupling protein*) 2 et 4

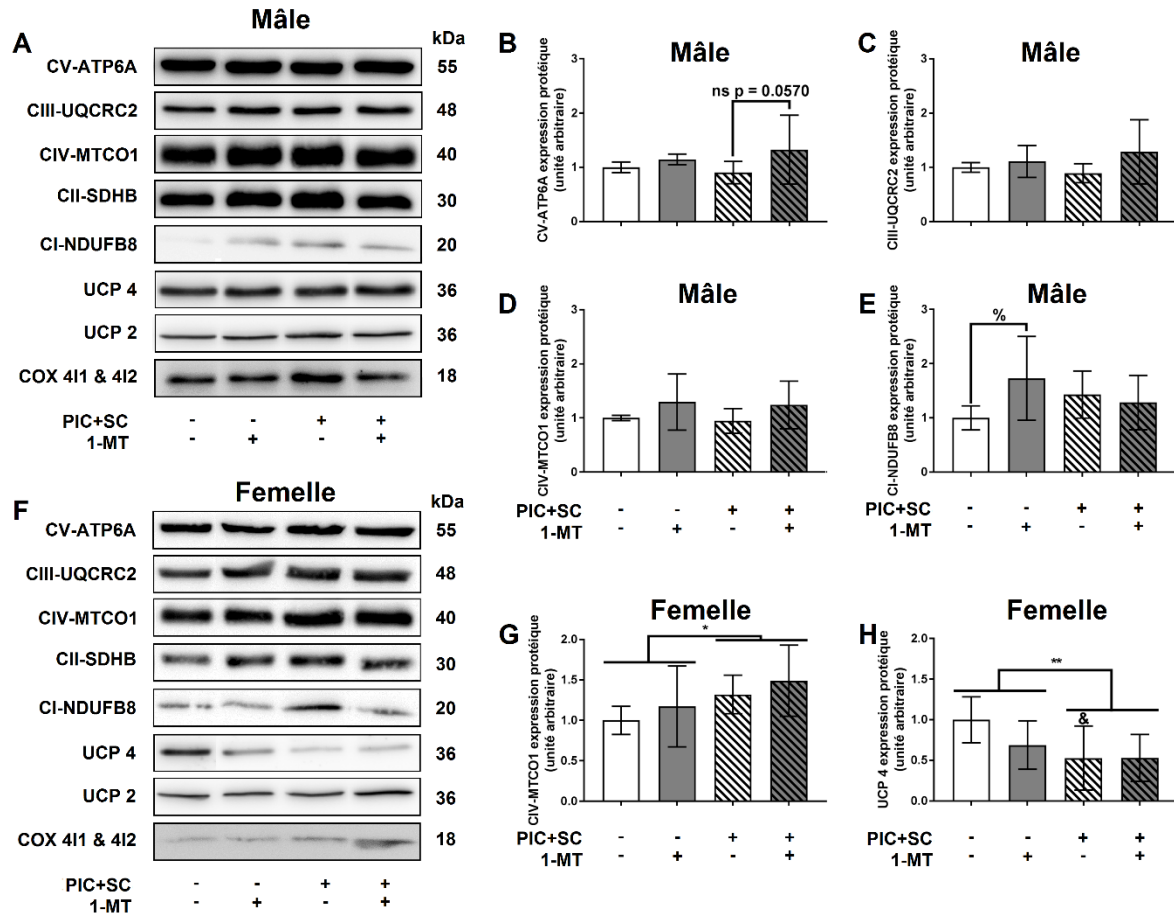


Figure 30 : Membranes de buvardages de type Western dans le PFC des souris mâles (A) et femelles (F). Résultats de la quantification pour CVATP6A (B), CIII-UQCRC2 (C), CIV-MTCO1 (D) et CI-NDUFB8 (E) dans le PFC des souris mâles. Résultats de la quantification pour CIV-MTCO1 (G) et UCP 4 (H) dans le PFC des souris femelles. Tous les résultats ont été normalisés sur les COX4I1 & COX4I2 et respectivement par rapport au groupe contrôle traité aux véhicules (moyenne fixée à 1). Tous les résultats ont été analysés par un ANOVA Two-way (condition x traitement). % p < 0.05 compare le groupe contrôle traité véhicule au groupe THMs traité véhicule, & p < 0.05 compare le groupe contrôle traité véhicule au groupe contrôle traité 1-MT, * p < 0.05 et ** p < 0.01 compare les groupes contrôles aux groupes THMs indépendamment des traitements (mâles n=7-8 ; femelles n=7-8).

L'analyse des résultats de buvardages de type Western dans le PFC des souris mâles démontre une augmentation significative de l'expression de la sous-unité CV-ATP6A suite au traitement 1-MT dans le PFC des souris mâles THMs et contrôles ($F_{1,26} = 4.875$; $P < 0.05$ (Figure 30B)), et

un résultat post-hoc de Bonferroni montrant une tendance à l'augmentation dans le groupe THMs traité 1-MT comparativement aux souris traitées véhicules (+47 % ; $P = 0.0570$ (Figure 30B)). Un ANOVA Two-way montre une tendance à l'augmentation pour la sous-unité CIII-UQCRC2 ($F_{1,27} = 4.057$; $P = 0.0541$ (Figure 30C)) et une augmentation de l'expression protéique dans les groupes contrôles et THMs en réponse au traitement 1-MT pour les sous-unités CIV-MTCO1 ($F_{1,26} = 4.722$; $P < 0.05$ (Figure 30D)). Une interaction entre le 1-MT et la condition contrôle a été révélée par un ANOVA Two-way dans le PFC des souris mâles pour la sous-unité CI-NDUFB8 ($F_{1,27} = 5.383$; $P < 0.05$ (Figure 30E)) avec un post-hoc de Bonferroni montrant un effet du traitement 1-MT chez les souris contrôles (+73 % ; $P < 0.05$ (Figure 30E)). Dans le PFC des souris femelles, un ANOVA Two-way montre une augmentation significative de l'expression de la sous-unité CIV-MTCO1 dans le THMs comparativement aux souris contrôles ($F_{1,27} = 5.793$; $P < 0.05$ (Figure 30G)) et une diminution de l'expression des UCP4 ($F_{1,28} = 7.79$; $P < 0.01$ (Figure 30H)). De plus, un résultat post hoc de Bonferroni montre une diminution significative de l'expression des UCP4 dans le PFC des souris femelles THMs traitées véhicules comparativement aux souris contrôles traitées véhicules (-47 % ; $P < 0.05$ (Figure 30H)).

4. Discussion

		THMs		Dimorphisme sexuel
		Véhicule	1-MT	
<i>Complexe I</i>	Respiration PFC/Striatum	Mâle Ø/↑ Femelle Ø/Ø	Mâle Ø/Ø Femelle Ø/↑	Tendance à l'augmentation de la respiration dans le PFC des souris femelles comparativement aux mâles
	Production d'ATP PFC /Striatum	Mâle Ø/Ø Femelle Ø/↓	Mâle Ø/Ø Femelle Ø/Ø	
<i>Complexe II</i>	Respiration PFC/Striatum	Mâle ↑/Ø Femelle Ø/Ø	Mâle Ø/Ø Femelle Ø/Ø	Augmentation de la respiration dans le PFC des souris femelles contrôles comparativement aux mâles
	Production d'ATP PFC /Striatum	Mâle Ø/Ø Femelle Ø/Ø	Mâle ↓/Ø Femelle Ø/Ø	La production d'ATP et la respiration dans le PFC des souris femelles contrôle augmentent comparativement aux mâles Une interaction entre le striatum des souris femelles du THMs avec le 1-MT à augmenter la production d'ATP comparativement aux mâles
<i>Complexe I et II</i>	Respiration PFC/Striatum	Mâle Ø/↑ Femelle Ø/Ø	Mâle Ø/Ø Femelle Ø/↑	La respiration dans le striatum des souris femelles du THMs diminue de -39 % comparativement aux souris mâles et augmente dans le PFC de +72 %
	Production d'ATP PFC /Striatum	Mâle Ø/Ø Femelle Ø/Ø	Mâle ↓/Ø Femelle Ø/Ø	Production d'ATP plus importante dans le PFC des souris contrôles femelles que chez les mâles
<i>Activité de fuite</i>	Respiration PFC /Striatum	Mâle Ø/Ø Femelle Ø/Ø	Mâle Ø/Ø Femelle Ø/↑	Réponse au 1-MT dans le striatum des souris mâles THMs diminue l'activité respiratoire comparativement aux souris femelles THMs
	Production d'ATP PFC /Striatum	Mâle Ø/Ø Femelle Ø/Ø	Mâle ↓↓ Femelle Ø/Ø	Réponse au 1-MT dans le striatum et le PFC des souris mâles THMs diminue la production d'ATP comparativement aux souris femelles THMs.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des dimorphismes sexuels observés dans le projet. Ø Pas de changement ↑ augmentation significative ; ↓ diminution significative ; PFC cortex préfrontal ; THMs (modèle PIC+SC).

Pour mémoire, l'hypothèse de travail était que les dérégulations de l'activité mitochondriale dans le modèle murin à double atteinte de schizophrénie sont causées par l'augmentation du glutamate en lien avec l'augmentation de la production d'acide kynurénique astrocytaire et, le traitement au 1-méthyl-DL-tryptophane permettrait de restaurer les fonctions normales de la mitochondrie. Les objectifs du projet étaient, d'identifier les troubles de l'activité respiratoire et de la production d'ATP avec pour sous objectif d'évaluer l'existence de la respiration de fuite mitochondriale et ensuite, d'évaluer les niveaux d'expression des protéines UCP2, UCP4 et des complexes OXPHOS pour enfin vérifier si le traitement au 1-MT permettait de restaurer l'activité respiratoire, la production d'ATP et l'expression protéique confirmant que les modifications étaient dues à l'augmentation de la production de KYNA dans les astrocytes.

Comme le montre le tableau récapitulatif ci-dessus, les résultats obtenus ne confirment pas l'hypothèse. En effet, le 1-MT ne provoque qu'une diminution de la production d'ATP à la fois chez les souris contrôles, mais également chez les souris du modèle THMs bien que le modèle lui-même ne provoque pas de hausse de la production d'ATP. En revanche, le modèle induit une augmentation de l'activité respiratoire chez les souris mâles et plus particulièrement dans le striatum par une sur activation du complexe I, de la co-activation des complexes I et II et dans le PFC par une sur activation dans le modèle du complexe II ; ces diverses anomalies ne sont pas bloquées par le 1-MT. Par ailleurs de nombreux dimorphismes sexuels ont été révélés.

Il existe dans ce projet différentes limites que sont :

- Le glutamate n'a pas été dosé dans le cortex préfrontal ni dans le striatum. Ceci implique qu'il est impossible de démontrer une

augmentation du niveau de glutamate dans le modèle et que le traitement à un effet même partiel sur les niveaux de glutamate.

- Le 1-MT est un inhibiteur spécifique de l'IDO mais il existe une redondance créée par la TDO (tryptophane 2,3-dioxygénase) (non quantifié par buvardage de types Western ou par qRT-PCR). Il est donc possible que la TDO soit surexprimée ou suractivée pour compenser l'inhibition de l'IDO.
- La dose du 1-MT a été choisie afin d'obtenir 50 % de réponse sans pour autant avoir été confirmée chez les souris traitées créant à la fois une variabilité et une incertitude des résultats.
- Les souris n'ont pas été soumises à un contrôle alimentaire en amont des tests ce qui pourrait également expliquer une partie de la variabilité des résultats de l'activité respiratoire.
- Le kit MitoXpress de mesure de la respiration mitochondriale est lui-même une limite du fait de la grande variabilité pouvant être d'un facteur 10 au sein des *triplicata* que ce soit intra-plaque mais aussi une forte variabilité inter-plaques.
- Il existe d'autres sources de glutamate. En effet, tel que le présente la figure 10, l'arginine, l'histidine, la proline et l'arginine sont des acides aminés pouvant former du glutamate pour le fonctionnement du cycle de Krebs. Ces différentes sources possibles n'ont pas été vérifiées.

La littérature actuelle ne permet pas d'expliquer complètement ces résultats. Dans les parties suivantes, plusieurs pistes seront introduites pour tenter d'expliquer partiellement les résultats du projet. Un projet d'étude possible ayant pour but de compléter les résultats actuels du projet sera également proposé.

4.1 Dynamique mitochondriale

4.1.1 Dynamique intramitochondriale

La dynamique intramitochondriale regroupe les phénomènes d'assemblages et de désassemblage des respirasomes (cf 4.1.1.1 Respirasome), de mouvements des protéines dans les membranes, d'activation et de désactivation de protéines dans la mitochondrie. La dynamique intramitochondriale regroupe donc tous les phénomènes reliant son activité aux différents phénomènes retrouvés dans la mitochondrie qui module son activité.

4.1.1.1 Respirasome

Les complexes OXPHOS étudiés ici sont formés de différentes sous-unités dont l'assemblage permet de favoriser leur activité spécifique. Ces complexes sont majoritairement transmembranaires sur la membrane interne de la mitochondrie et vont avoir un mouvement de transport du fait de la fluidité membranaire. Bien que ces complexes soient souvent présentés sous une forme linéaire, ils vont en réalité former les supercomplexes ou respirasomes (Vinogradov, 1998). Ces respirasomes sont donc formés par différents complexes et leurs compositions favorisent les réactions et donc leur activité. Ainsi, un respirasome sera formé d'un complexe I, de deux complexes III, et de 0 à 4 complexes IV (Schägger et Pfeiffer, 2001). La différence dans la composition de ces complexes et leurs abondances respectives au sein de la mitochondrie peut faire varier l'activité globale (Buck et al., 2014) (Genova et Lenaz, 2014). Par ailleurs, certains complexes, en proportion variable, peuvent rester isolés dans la mitochondrie et présenter une activité malgré tout (Schägger et Pfeiffer, 2001). Dans cette étude, cela reste spécifique à un type cellulaire cependant, il a été démontré que dans des mêmes tissus la composition et l'abondance des respirasomes varient entre différentes sortes de souris (Buck et al., 2014). Il est donc possible de supposer que

le modèle et les traitements peuvent entraîner une réorganisation des respirasomes.

4.1.1.2 Complexes OXPHOS de réserves

La plupart des sous-unités des complexes OXPHOS sont codées par des gènes nucléaires (cf 1.4.1.1.1 Chaîne respiratoire) et de ce fait un système d'import mitochondrial a été mis en place. En effet, le complexe protéique comprenant différentes protéines TOM prend en charge le passage du cytosol vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie où certains de ces complexes y seront conservés afin d'être mobilisables par les mitochondries via l'activation des protéines MIA40 et AIF prenant en charge le recrutement des sous-unités et favoriser l'assemblage des complexes, soit le complexe I et le complexe IV dans cet exemple (Hell, 2008) (Meyer et al., 2015). Cependant, il s'agit d'un système qui peut être perturbé du fait de la formation de ponts disulfures pouvant être clivés par des antioxydants (cf 1.3.2 Statut et molécules antioxydantes).

4.1.1.3 Effet des ROS

Les ROS sont produits dans la mitochondrie (cf 1.3 Stress oxydatif et 1.3.1 Statut et molécules pro-oxydantes) et auront de multiples rôles. En effet, le stress oxydatif crée une peroxydation de la membrane lipidique, engendrant une déstabilisation des supercomplexes et plus particulièrement une déstabilisation du complexe I et une dysfonction dans le transfert d'électrons entre les complexes devenant moins efficaces (Lenaz et al., 2010). Cependant, les ROS ne sont pas que néfastes, car ils ont d'autres rôles plus physiologiques. En effet, les ROS vont possiblement activer les UCP lors de différents processus tels qu'une atténuation de la production de ROS, l'export d'acide gras anionique ou peroxydé (Brand et Esteves, 2005). Les ROS ont également un rôle dans la

réponse inflammatoire. À ce sujet, une étude sur des macrophages de souris C57BL6 traitées par du LPS (lipopolysaccharide) sous-expriment les UCP2, augmentent la production de ROS entraînant une activation des ERK/p38 et induire une transcription nucléaire pour une réponse inflammatoire (Emre et al., 2007).

4.1.1.4 Lien entre la dynamique intramitochondriale et les résultats du projet

Il existe un lien entre les résultats du projet et la dynamique intramitochondriale. En effet, le modèle THMs est un modèle où il y a une surproduction de ROS (Deslauriers et al., 2013) (Kim et al., 2005). Bien que les ROS ne soient pas quantifiés dans ce projet, ils devraient présenter un effet sur la stabilité des respirasomes tels que mentionnés au point « 4.1.1.3 Effet des ROS ». Il est donc possible de s'attendre à ce que la composition et la répartition en termes de pourcentage de présence de ces respirasomes soient directement modulés dans le modèle et les traitements. Bien qu'un essai ait été réalisé pour étudier ces remaniements, le manque d'anticorps spécifique pour la forme tertiaire et quaternaire des respirasomes a empêché de l'évaluer. De plus, le traitement 1-MT cause une surexpression des complexes CI-NDUFB8, CIII-UQCRC2, CIV-MTCO1 et CV-ATP6A à la fois dans les PFC des souris contrôles et THMs mâles. Bien que le glutamate n'ait pas été mesuré dans ce projet, il apparaît que le 1-MT module majoritairement la production d'ATP à la baisse et en produisant une augmentation de l'expression protéique des complexes utilisés pour la formation des respirasomes. Il est donc possible de penser à une nouvelle répartition des conformations des respirasomes, mais comme mentionné ci-dessus, il a été impossible de le confirmer. Enfin, un remodelage dans l'expression des CIV-MTCO1 et des UCP4 dans le PFC des souris femelles a été observé. La diminution de l'expression des UCP4 dans le PFC des souris THMs femelles pourrait être corrélée aux dimorphismes sexuels observés entre les mâles et les femelles du THMs. Par ailleurs, à la fois chez les mâles et

chez les souris femelles, une hyper variabilité interindividuelle a été observé dans l'expression des complexes OXPHOS et des UCP2 et 4 dans le striatum.

Cette étude pourrait être complétée par une série d'expériences où les souris seraient castrées chimiquement ou chirurgicalement puis injectées avec des hormones sexuelles du sexe opposé pour vérifier à la fois les dimorphismes sexuels et les différences notées dans l'expression des protéines, en plus du lien possible entre l'activité intramitochondriale et les hormones sexuelles. Par ailleurs, ceci permettrait de statuer sur l'interaction entre les mitochondries, les hormones et aussi d'explorer plus avant la neuroprotection par les hormones dans la schizophrénie.

4.1.2 Dynamique extra-mitochondriale

Tout comme la dynamique intramitochondriale (cf 4.1.1) regroupe des phénomènes interne à la mitochondrie et présentant des effets sur son activité, il existe des processus externes à la mitochondrie tel que des interactions avec le réticulum endoplasmique (cf 4.1.2.1 Réticulum endoplasmique et calcium) qui module l'activité des mitochondries mais également le renouvellement de ces dernières.

4.1.2.1 Réticulum endoplasmique et calcium

Le réticulum endoplasmique tout comme la mitochondrie est un organite intracellulaire qui présente une multitude d'actions essentielles aux cellules et aux organismes vivants qui ne seront pas développées ici. En revanche, le réticulum endoplasmique participe à la dynamique mitochondriale. En effet, le réticulum va, de par les protéines MFF (de l'anglais *mitochondrial fission factor*), interagir avec les protéines mitochondriales DRP1 (de l'anglais *dynamamin-related protein 1*) (Rowland et Voeltz, 2012). Pour ce faire, le réticulum endoplasmique émet

une projection membranaire qui vient enlacer la mitochondrie et l'interaction DRP1-MFF permet de rapprocher les membranes mitochondriales jusqu'à produire la fission mitochondriale, c'est-à-dire permettre le renouvellement de mitochondrie en scindant une mitochondrie préexistante en deux.

4.1.2.2 Flux de calcium entre réticulum endoplasmique et mitochondrie

Le réticulum endoplasmique opère un transfert de calcium vers la mitochondrie via le VDAC1 (de l'anglais *voltage-dependent anion-selective channel protein 1*) et le MCU (de l'anglais *mitochondrial calcium uniporter*) ce qui permet de créer un influx de calcium (Rowland et Voeltz, 2012). Ces influx de calcium permettent l'activation de l'ATP synthase (taux plus élevé de calcium) pour la production d'ATP ou une activation des UCP2 (faible taux de calcium) pour la production de chaleur et la dissipation du gradient protonique (Horvath et al., 2003).

4.1.2.3 Lien entre la dynamique extra-mitochondriale et les résultats du projet

Les résultats du projet comportent une limitation du fait de l'étude sur des mitochondries isolées. En effet, la dynamique extra-mitochondriale y est par conséquent absente de par l'absence du réticulum endoplasmique et de la signalisation calcique qui comme mentionné au point « 4.1.2.2 Flux de calcium entre réticulum endoplasmique et mitochondrie » permet de réguler l'activation de l'ATP synthase et des UCP donc pour la production d'énergie ou de chaleur. Ceci pourrait expliquer les résultats de l'activité de fuite qui demeure inchangée entre le modèle et les souris contrôles.

4.2 Modulateur externe

Ici, les modulateurs externes représentent des composées internes de l'organisme tel que des hormones, des neurotransmetteurs, des peptides ou neuropeptides qui auront un effet direct ou indirect sur l'activité mitochondriale.

4.2.1 Dopamine

La dopamine et ses dérivés modulent l'activité mitochondriale. En effet, à forte concentration, la dopamine (2×10^{-6} M à 10^{-4} M) affecte l'activité de l'ATP synthase, de la cytochrome c oxydase et du complexe I (Ben-Shachar et al., 2004). Dans la schizophrénie (une condition hyperdopaminergique, au moins au niveau du striatum), l'expression protéique des sous-unités du complexe I est diminuée et tout particulièrement les sous-unités de 24 kDa (56 %) et 51 kDa (34 %). Cependant, cette étude fut réalisée sur des patients humains post-mortem ayant subi des années de médications ce qui peut avoir faussé les résultats (Karry et al., 2004). Le complexe I est la cible des différents composés, par exemple la noradrénaline, qui semblerait inhiber l'activité du complexe I, et la dopamine, qui a un site d'interaction avec la NDUFV1 du complexe I pour inhiber son activité (Ben-Shachar et al., 2004) (Ben-Shachar, 2017). Le modèle présenterait une dérégulation dopaminergique au vu de l'augmentation du taux de renouvellement de la dopamine. Il est donc envisageable de penser que les taux de glutamate et de dopamine seraient interconnectés (sans lien direct) pour moduler l'activité mitochondriale.

4.2.2 Œstrogène et testostérone

Au vu des nombreux dimorphismes sexuels découverts dans ce projet, il est intéressant, d'explorer l'effet des œstrogènes, de la

testostérone et de leurs dérivés sur l'activité mitochondriale. Des études ont démontré l'implication directe d'hormones sexuelles dérivant des œstrogènes et de la testostérone dans l'expression protéique des complexes OXPHOS, mais aussi dans l'OCR (de l'anglais *oxygen consumption rate*). En effet, une injection de 17- β -œstradiol chez des rates ayant subi une ovariectomie sera associée à une augmentation significative de la respiration dans les neurones, mais aussi dans les cellules gliales, une surexpression de sous-unités liées aux complexes I, IV et III (complexes qui servent à la formation des respirasomes (cf 4.1.1.1 Respirasome)) et à une diminution de lipides peroxydés (Araú et al., 2008) (Irwin et al., 2012). Une étude sur la testostérone a également été réalisée et bien que les résultats de celle-ci soient moins pertinents statistiquement et que cette étude a été réalisée sur des muscles, il y est retrouvé malgré tout une augmentation d'ARNm de certaines sous-unités des complexes OXPHOS à la fois provenant du génome nucléaire, mais également provenant du génome mitochondrial, ainsi qu'une surexpression de protéines liées au processus de fission et de fusion mitochondriale (Guo et al., 2012).

4.3 Dimorphismes sexuels clinique dans la schizophrénie

De nombreuses études cliniques et précliniques mettent en avant de nombreux dimorphismes sexuels dans une multitude de pathologie, et la schizophrénie n'y échappe pas. D'abord, du point de vue anatomique, les femmes présenteraient un volume de l'amygdale orbitofrontal plus élevé par rapport aux hommes. Chez les schizophrènes une réponse sexuelle dimorphique est observable. En effet, chez les patients l'amygdale augmente de volume alors que chez les patientes, elle diminue (Gur et al., 2004). Il a également été démontré que les femmes présentent un volume relativement plus important de matière grise corticale, d'hypothalamus et de cortex préfrontal. Au-delà de la neuroanatomie, les patientes schizophréniques présentent de meilleurs résultats dans les tests

de mémoires, moteurs et de communications par rapport aux patients (Mendrek, 2007).

L'explication ou hypothèse actuelle résiderait dans les effets neuroprotecteurs de l'œstrogène lors du développement du cerveau. D'autre part un débalancement d'hormones plus « féminines » a été mis au jour chez les patients schizophrènes. Par ailleurs, les œstrogènes présenteraient un effet protecteur vis-à-vis de certains inhibiteurs de la chaîne respiratoire (Gonçalves et al., 2019).

Les résultats du projet présentent des phénomènes de dimorphismes sexuel, c'est-à-dire une activité des complexes globalement plus importante chez les femelles et une réponse sexuelle dimorphique qui reste opposée entre les deux sexes.

Ainsi les résultats obtenus dans cette étude semblent s'inscrire dans la liste des dimorphismes sexuels observés en clinique et ils sembleraient être liés aux hormones durant la phase de développement du cerveau *in-utero* (Mendrek, 2007). Les différences neurodéveloppementale et physiopathologiques liées à l'œstrogène et la testostérone restent à ce jour méconnues.

4.4 Résumé

Pour conclure et résumer la discussion, il semblerait donc que les complexes OXPHOS soient soumis à de nombreuses variables aussi bien intra mitochondriales qu'extra mitochondriales et ces différents facteurs vont-ils moduler la traduction et la transcription des sous-unités

des complexes OXPHOS, mais aussi l'activité respiratoire et la production d'ATP (Figure 31).

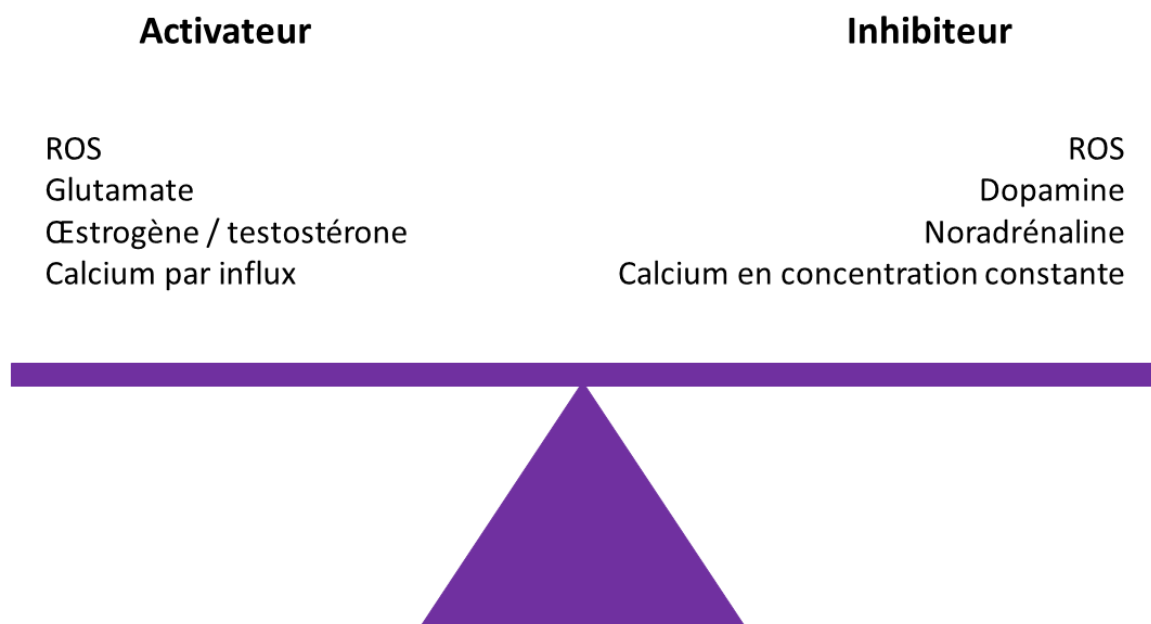


Figure 31 : Balance activateur - inhibiteur de l'activité mitochondriale.

Ainsi, il est possible de supposer que la dérégulation d'un ou de plusieurs activateurs / inhibiteurs pourrait être compensées par la variation d'autres régulateurs. Donc, la dérégulation de l'activité mitochondriale dans la schizophrénie résulterait d'une multitude de changements qui auront individuellement plus ou moins d'effet sur son activité. Dans ce projet, l'effet de la variation du glutamate a pu être contrebalancée par les hormones sexuelles pour rappeler les nombreux dimorphismes sexuels, mais également la dopamine et la noradrénaline ont également pu participer à masquer l'effet du traitement 1-MT dans le modèle.

4.5 Perspectives

Il serait donc intéressant ici de réaliser des dosages de différents composés tels que la dopamine, glutamate, œstrogène, testostérone, KYNA, etc. ainsi que de leurs dérivés et de leurs précurseurs afin de les mettre en relation avec l'activité mitochondriale c'est-à-dire la respiration et la production d'ATP (Figure 32). La figure 32 représente les trois types de résultats auxquels il est possible de s'attendre en mettant en lien les quantités des composés mesurés par rapport aux activités obtenues.

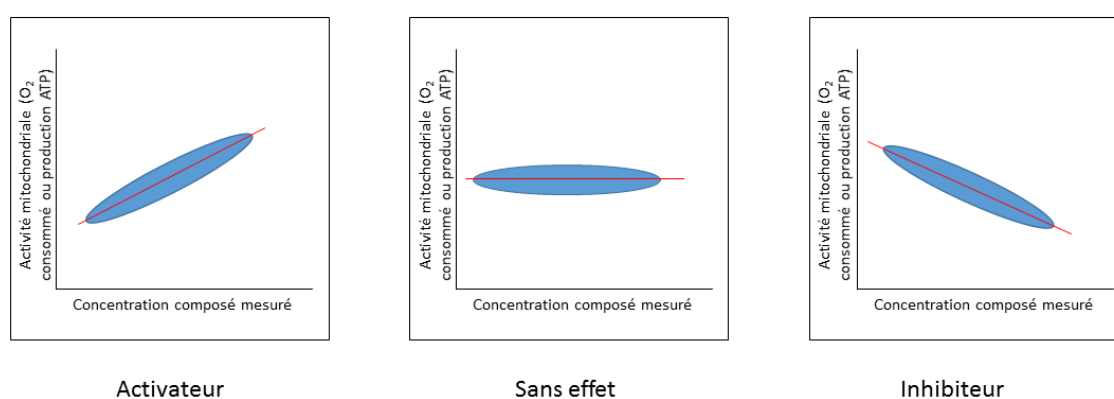


Figure 32 : Droite dose de l'activité mitochondriale (respiration mitochondriale et production d'ATP) en fonction des composés mesurés. L'ovale bleu représentant la dispersion expérimentale attendue et la droite rouge représenterait la tendance de l'effet des composés mesurés sur l'activité mitochondriale.

Il serait aussi intéressant de faire de l'imagerie calcique sur cellules isolées et entières à l'aide d'une sonde spécifique aux mitochondries et d'y tester par BRET et par imagerie le lien entre la MFF et la Drp1 et les quantifier pour rendre compte du processus de fission mitochondriale faisant référence à la dynamique extra-mitochondriale et donc du lien entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie.

Ainsi, une idée plus précise pourra être faite des différents activateurs et inhibiteurs liés à l'activité mitochondriale au sein du modèle en réponse aux différents traitements, ce qui permettrait par la suite de cibler plus précisément ceux qui seraient potentiellement

responsables des dérégulations de l'activité mitochondriale dans le PFC et plus particulièrement dans le striatum, mais aussi de mieux comprendre et appréhender les dimorphismes sexuels.

5. Remerciements

Je tiens tout particulièrement à remercier Sylvain Grignon MD PhD de m'avoir permis de faire une maîtrise dans son laboratoire. J'ai pu de par le projet qu'il m'a été confié, développer mes connaissances scientifiques, de développer mon sens critique, d'apprendre de nouvelles techniques et d'en élaborer d'autres. Je tiens également à le remercier de m'avoir permis de participer à de nombreux congrès tant locaux qu'internationaux et d'y avoir présenté mes résultats de projets quant à l'oral que par affiche.

Je tiens également à remercier mon codirecteur de recherche Philippe Sarret PhD de m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour son regard externe à mon projet. Je tiens également à remercier toute l'équipe et tous les étudiants sous sa direction pour leur accueil, leur soutien tant d'un point de vue technique et expérimental que par l'apport de connaissance dans les neurosciences et d'autres domaines qui m'ont permis d'améliorer, de développer des techniques et compétences. Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe pour la bonne ambiance quotidienne.

Je remercie également Cécile Monpays pour son accueil et pour m'avoir formé dès mon arrivée et tout particulièrement je tiens à remercier Caroline Maurice-Gélinas pour son accueil, sa formation et ses divers conseils et soutiens tout le long de ce projet.

Je remercie également le directeur du département de psychiatrie Jean-François Trudel pour son appui financier que le département apporte au laboratoire. Le secrétariat du département de psychiatrie est également

pour le soutien technique pour l'approvisionnement du laboratoire et pour les démarches administratives.

Je remercie les professeurs Denis Gris PhD et le professeur Xavier Roucou PhD d'avoir accepté de prendre le temps pour la correction de mon mémoire en tant que membre interne et externe au département.

Je tiens également à remercier les membres de ma famille m'ayant soutenu et encouragé durant la durée de mes études.

6. Liste des références

- Ahn, C. S., & Metallo, C. M. (2015). Mitochondria as biosynthetic factories for cancer proliferation. *Cancer and Metabolism*, 3(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40170-015-0128-2>
- Araú, G. W., Beyer, C., & Arnold, S. (2008). Oestrogen influences on mitochondrial gene expression and respiratory chain activity in cortical and mesencephalic astrocytes. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(7), 930–941. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01747.x>
- Archibald, J. M. (2015). Review Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Current Biology*, 25(19), R911–R921. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.07.055>
- Arechaga, I., & Jones, P. C. (2001). The rotor in the membrane of the ATP synthase and relatives. *FEBS Letters*, 494(1–2), 1–5. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02300-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02300-6)
- Azarias, G., Perreten, H., Lengacher, S., Poburko, D., Demareux, N., Magistretti, P. J., & Chatton, J.-Y. (2011). Glutamate Transport Decreases Mitochondrial pH and Modulates Oxidative Metabolism in Astrocytes. *Journal of Neuroscience*, 31(10), 3550–3559. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4378-10.2011>
- Bayer, T. A., Falkai, P., & Maier, W. (1999). Genetic and non-genetic vulnerability factors in schizophrenia: The basis of the “Two hit hypothesis.” *Journal of Psychiatric Research*, 33(6), 543–548. [https://doi.org/10.1016/S0022-3956\(99\)00039-4](https://doi.org/10.1016/S0022-3956(99)00039-4)
- Beckman, J. S. (1996). Oxidative damage and tyrosine nitration from peroxynitrite. *Chemical Research in Toxicology*, 9(5), 836–844. <https://doi.org/10.1021/tx9501445>
- Belforte, J. E., Zsiros, V., Sklar, E. R., Jiang, Z., Yu, G., Li, Y., ... Nakazawa, K. (2010). Postnatal NMDA receptor ablation in corticolimbic interneurons confers schizophrenia-like phenotypes. *Nature Neuroscience*, 13(1), 76–83. <https://doi.org/10.1038/nn.2447>
- Ben-Shachar, D., Zuk, R., Gazawi, H., & Ljubuncic, P. (2004). Dopamine toxicity involves mitochondrial complex I inhibition: Implications to dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Biochemical Pharmacology*, 67(10), 1965–1974. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.02.015>
- Ben-Shachar, Dorit. (2009). The interplay between mitochondrial complex I, dopamine and Spl in schizophrenia. *Journal of Neural Transmission*, 116(11), 1383–1396. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0319-5>
- Ben-Shachar, Dorit. (2017). Mitochondrial multifaceted dysfunction in schizophrenia; complex I as a possible pathological target.

- Schizophrenia Research*, 187, 3–10.
<https://doi.org/10.1016/j.schres.2016.10.022>
- Ben-Shachar, Dorit, Zuk, R., Gazawi, H., Reshef, A., Sheinkman, A., & Klein, E. (1999). Increased mitochondrial complex I activity in platelets of schizophrenic patients. *International Journal of Neuropsychopharmacology*, 2(4), 245–253.
<https://doi.org/10.1017/S1461145799001649>
- Bergman, O., & Ben-Shachar, D. (2016). Mitochondrial Oxidative Phosphorylation System (OXPHOS) Deficits in Schizophrenia. *The Canadian Journal of Psychiatry*, 61(8), 457–469.
<https://doi.org/10.1177/0706743716648290>
- Berman, S. B., & Hastings, T. G. (2003). Dopamine Oxidation Alters Mitochondrial Respiration and Induces Permeability Transition in Brain Mitochondria. *Journal of Neurochemistry*, 73(3), 1127–1137.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.0731127.x>
- Bitanihirwe, B. K. Y., & Woo, T. U. W. (2011). Oxidative stress in schizophrenia: An integrated approach. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 35(3), 878–893.
<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.10.008>
- Boksa, P. (2008). Maternal infection during pregnancy and schizophrenia. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 33(3), 183–185.
- Brand, M. D. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology*, 35(6–7), 811–820.
[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(00\)00135-2](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(00)00135-2)
- Brand, Martin D., & Esteves, T. C. (2005). Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metabolism*, 2(2), 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2005.06.002>
- Brown, A. S., Schaefer, C. A., Quesenberry, C. P., Liu, L., Babulas, V. P., & Susser, E. S. (2005). Maternal exposure to toxoplasmosis and risk of schizophrenia in adult offspring. *American Journal of Psychiatry*, 162(4), 767–773. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.162.4.767>
- Buck, K. J., Walter, N. A. R., & Denmark, D. L. (2014). Genetic variability of respiratory complex abundance, organization and activity in mouse brain. *Genes, Brain and Behavior*, 13(2), 135–143.
<https://doi.org/10.1111/gbb.12101>
- Burris, Thadeus, Molski, T. F., XU, C., Ryan, E., Katsura, T., ... Molinoff, P. B. (2002). Strathprints Institutional Repository (2013) Pre- school children creating and communicating with digital technologies in the home. *British Journal of Educational Technology*, 44(3), 421–431. <https://doi.org/10.1124/jpet.102.033175>.Carson
- C., F., & D., S. (1999). The mitochondrial uncoupling protein-2: Current status. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*,

- 31(11), 1261–1278. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00049-7](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00049-7)
- Carlson, E. A., & Yan, S. S. (2014). *Disrupting cancer cell function by targeting mitochondria*. 1(2), 17–25. <https://doi.org/10.15761/ICST.1000105>
- Celanire, S., & Poli, S. (2015). *Small Molecule Therapeutics for Schizophrenia* (Vol. 13). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-11502-3>
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527–605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>
- Clay, H. B., Sullivan, S., & Konradi, C. (2011). Mitochondrial dysfunction and pathology in bipolar disorder and schizophrenia. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 29(3), 311–324. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2010.08.007>
- Crow, T. J. (1980). Molecular pathology of schizophrenia: more than one disease process? *British Medical Journal*, (January), 66–68. <https://doi.org/10.1136/bmj.280.6207.66>
- Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J. H., Osiewacz, H. D., & Rycovska, A. (2011). *Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria*. 108(34). <https://doi.org/10.1073/pnas.1103621108>
- Deslauriers, J., Larouche, A., Sarret, P., & Grignon, S. (2013). Combination of prenatal immune challenge and restraint stress affects prepulse inhibition and dopaminergic/GABAergic markers. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 45, 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.05.006>
- Deslauriers, J., Lefrançois, M., Larouche, A., Sarret, P., & Grignon, S. (2011). Antipsychotic-induced DRD2 upregulation and its prevention by α -lipoic acid in SH-SY5Y Neuroblastoma cells. *Synapse*, 65(4), 321–331. <https://doi.org/10.1002/syn.20851>
- Ebert, A. M., & Leckman, J. (2015). *Title : CURRENT Diagnosis and Treatment Psychiatry , 3 / e Title : Color Atlas and Synopsis of Congenital Cardiology*. (April).
- Emre, Y., Hurtaud, C., & Ubel, T. N. (2007). *Mitochondria contribute to LPS-induced MAPK activation via uncoupling protein UCP2 in macrophages*. 278, 271–278. <https://doi.org/10.1042/BJ20061430>
- Endoh, M., & Brodde D Reinhardt H J Schumann, O. E. (1973). ArZlleimille/·Foysch. Nallll.vn.Schfl/Ied~hng. \· Arch. Exp. P(Lth. Phorm(Lk, 14(2), 495–501. Retrieved from <https://www.nature.com/articles/261717a0.pdf>
- Genova, M. L., & Lenaz, G. (2014). Biochimica et Biophysica Acta Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes ☆. *BBA -*

- Gonçalves, V. F., Cuperfain, A. B., & Kennedy, J. L. (2019). Sex differences in schizophrenia: estrogen and mitochondria. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 44(1), 216–217. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0228-0>
- Gordon, J. A. (2010). Testing the glutamate hypothesis of schizophrenia. *Nature Neuroscience*, 13(1), 2–4. <https://doi.org/10.1038/nn0110-2>
- Guo, W., Wong, S., Li, M., Liang, W., Liesa, M., Serra, C., ... Bhasin, S. (2012). Testosterone Plus Low-Intensity Physical Training in Late Life Improves Functional Performance, Skeletal Muscle Mitochondrial Biogenesis, and Mitochondrial Quality Control in Male Mice. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051180>
- Gur, R. E., Kohler, C., Turetsky, B. I., Siegel, S. J., Kanes, S. J., Bilker, W. B., ... Gur, R. C. (2004). A sexually dimorphic ratio of orbitofrontal to amygdala volume is altered in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 55(5), 512–517. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.10.009>
- Harper, M., & Brand, D. (1993). (C = 0.3). *Measurement*, 268(20), 14850–14860.
- Hell, K. (2008). THell, K. (2008). The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(4), 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2007.12.005>he Erv1-Mia40 disulfide relay system. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1783(4), 601–609. <https://doi.org/10.1016/j.bbamer.2007.12.005>
- Herrmann, P. C., Gillespie, J. W., Charboneau, L., Bichsel, V. E., Paweletz, C. P., Calvert, V. S., ... Iii, E. F. P. (2003). *Mitochondrial proteome: Altered cytochrome c oxidase subunit levels in prostate cancer*. (Lcm), 1801–1810. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300461>
- Hirst, J. (2013). *Mitochondrial Complex I*. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-070511-103700>
- Ho, P. W. L., Ho, J. W. M., Tse, H. M., So, D. H. F., Yiu, D. C. W., Liu, H. F., ... Ho, S. L. (2012). Uncoupling protein-4 (UCP4) increases ATP supply by interacting with mitochondrial complex II in neuroblastoma cells. *PLoS ONE*, 7(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032810>
- Holt, I. J., Harding, A. E., & Morgan-Hughes, J. A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature*, 331(6158), 717–719. <https://doi.org/10.1038/331717a0>

- Horvath, T. L., Diano, S., & Barnstable, C. (2003). *Mitochondrial uncoupling protein 2 in the central nervous system : neuromodulator and neuroprotector*. 65, 1917–1921. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00143-6](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00143-6)
- Irwin, R. W., Yao, J., To, J., Hamilton, R. T., Cadenas, E., & Brinton, R. D. (2012). Selective oestrogen receptor modulators differentially potentiate brain mitochondrial function. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(1), 236–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02251.x>
- Iwata, S., Lee, J. W., Okada, K., Lee, J. K., Iwata, M., Rasmussen, B., ... Jap, B. K. (1998). *Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc 1 Complex*. 281(July), 64–72.
- Ježek, P., & Garlid, K. D. (1998). Mammalian mitochondrial uncoupling proteins. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 30(11), 1163–1168. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00076-4](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00076-4)
- Karry, R., Klein, E., & Shachar, D. Ben. (2004). Mitochondrial complex I subunits expression is altered in schizophrenia: A postmortem study. *Biological Psychiatry*, 55(7), 676–684. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2003.12.012>
- Kato, T., Stine, O. C., McMahon, F. J., & Crowe, R. R. (1997). Increased levels of a mitochondrial DNA deletion in the brain of patients with bipolar disorder. *Biological Psychiatry*, 42(10), 871–875. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(97\)00012-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(97)00012-7)
- Kawamata, H., & Manfredi, G. (2017). *Proteinopathies and OXP HOS dysfunction in neurodegenerative diseases*. 216(12).
- Kay, S. R., Qpjer, L. A., & Fiszbein, A. (1987). The Positive and Negative Syndrome Scale (PANSS) for Schizophrenia. *Schizophrenia Bulletin*, 13(2), 261–276. <https://doi.org/10.1093/schbul/13.2.261>
- Khan, F. H., Sen, T., Maiti, A. K., Jana, S., Chatterjee, U., & Chakrabarti, S. (2005). Inhibition of rat brain mitochondrial electron transport chain activity by dopamine oxidation products during extended in vitro incubation: Implications for Parkinson's disease. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1741(1–2), 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2005.03.013>
- Kim, S. T., Choi, J. H., Chang, J. W., Kim, S. W., & Hwang, O. (2005). Immobilization stress causes increases in tetrahydrobiopterin, dopamine, and neuromelanin and oxidative damage in the nigrostriatal system. *Journal of Neurochemistry*, 95(1), 89–98. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03342.x>
- Konovalova, S. (2019). *Analysis of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes in Cultured Human Cells using Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Immunoblotting*. (February), 1–7. <https://doi.org/10.3791/59269>

- Koola, M. M. (2016). Kynurenine pathway and cognitive impairments in schizophrenia: Pharmacogenetics of galantamine and memantine. *Schizophrenia Research: Cognition*, 4, 4–9. <https://doi.org/10.1016/j.scog.2016.02.001>
- Koopman, W. J. H., Distelmaier, F., Smeitink, J. A. M., & Willems, P. H. G. M. (2012). Review OXPHOS mutations and neurodegeneration. *The EMBO Journal*, 32(1), 9–29. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.300>
- Krauss, S., Zhang, C. Y., & Lowell, B. B. (2005). The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(3), 248–261. <https://doi.org/10.1038/nrm1592>
- Laruelle, M. (2014). Schizophrenia: From dopaminergic to glutamatergic interventions. *Current Opinion in Pharmacology*, 14(1), 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.01.001>
- Lenaz, G., Baracca, A., Barbero, G., Bergamini, C., Elena, M., Del, M., ... Solaini, G. (2010). Biochimica et Biophysica Acta Mitochondrial respiratory chain super-complex I – III in physiology and pathology. *BBA - Bioenergetics*, 1797(6–7), 633–640. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.025>
- Lieberman, J. A., Perkins, D., Belger, A., Chakos, M., Jarskog, F., Boteva, K., & John, G. (2001). The Early Stages of Schizophrenia: Speculations on Pathogenesis, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *Society of Biological Psychiatry*, 50, 884–897. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01303-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01303-8)
- Lin, T. M., & Beal, M. F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative disease. *Nature Publishing Group*, 443, 787–795. <https://doi.org/10.1038/nature05292>
- Mendrek, A. (2007). Reversal of normal cerebral sexual dimorphism in schizophrenia: Evidence and speculations. *Medical Hypotheses*, 69(4), 896–902. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.01.064>
- Meyer, K., Buettner, S., Ghezzi, D., Zeviani, M., Bano, D., & Nicotera, P. (2015). Loss of apoptosis-inducing factor critically affects MIA40 function. *Cell Death and Disease*, 6(7), e1814-5. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.170>
- Meyer, U. (2006). The Time of Prenatal Immune Challenge Determines the Specificity of Inflammation-Mediated Brain and Behavioral Pathology. *Journal of Neuroscience*, 26(18), 4752–4762. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.0099-06.2006>
- Meyer, U. (2014). Prenatal Poly(I:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biological Psychiatry*, 75(4), 307–315. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.07.011>
- Minotti, G., & Auste, S. D. (1987). *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY The Requirement for Iron(III) in the Initiation of Lipid*

- Peroxidation by Iron(II) and Hydrogen Peroxide**. 262(3), 1098–1104.
- Miyadera, H., Shiomi, K., Ui, H., Yamaguchi, Y., Masuma, R., & Tomoda, H. (2003). *Atpenins*, potent and specific inhibitors of mitochondrial complex II (succinate-ubiquinone oxidoreductase). 100(2), 473–477.
- Monpays, C., Deslauriers, J., Sarret, P., & Grignon, S. (2016). Mitochondrial Dysfunction in Schizophrenia: Determination of Mitochondrial Respiratory Activity in a Two-Hit Mouse Model. *Journal of Molecular Neuroscience*, 440–451. <https://doi.org/10.1007/s12031-016-0746-3>
- Popoli, M., Yan, Z., McEwen, B. S., & Sanacora, G. (2012). The stressed synapse: The impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(1), 22–37. <https://doi.org/10.1038/nrn3138>
- Prabakaran, S., Swatton, J. E., Ryan, M. M., Huffaker, S. J., Huang, J. T. J., Griffin, J. L., ... Bahn, S. (2004). Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: Evidence for compromised brain metabolism and oxidative stress. *Molecular Psychiatry*, 9(7), 684–697. <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001511>
- Prince, J. a, Yassin, M. S., & Oreland, L. (1997). Neuroleptic-induced mitochondrial enzyme alterations in the rat brain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280(1), 261–267. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8996205>
- Rajasekaran, A., Venkatasubramanian, G., Berk, M., & Debnath, M. (2015). Mitochondrial dysfunction in schizophrenia: Pathways, mechanisms and implications. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 48, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.11.005>
- Robinson, T. E., & Becker, J. B. (1986). Enduring changes in brain and behavior produced by chronic amphetamine administration: A review and evaluation of animal models of amphetamine psychosis. *Brain Research Reviews*, 11(2), 157–198. [https://doi.org/10.1016/0165-0173\(86\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0165-0173(86)90002-0)
- Rowland, A. A., & Voeltz, G. K. (2012). contacts: function of the junction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(10), 607–615. <https://doi.org/10.1038/nrm3440>
- Rustin, P., Bourgeron, T., Parfait, B., Chretien, D., Munnich, A., & Rotig, A. (1997). *Inborn errors of the Krebs cycle a group of unusual mitochondrial.pdf*. 185–197.
- Schägger, H., & Pfeiffer, K. (2001). The Ratio of Oxidative Phosphorylation Complexes I-V in Bovine Heart Mitochondria and the Composition of Respiratory Chain Supercomplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), 37861–37867. <https://doi.org/10.1074/jbc.M106474200>

- Schwarcz, R., Rassoulpour, A., Wu, H. Q., Medoff, D., Tamminga, C. A., & Roberts, R. C. (2001). Increased cortical kynurenate content in schizophrenia. *Biological Psychiatry*, 50(7), 521–530. [https://doi.org/10.1016/S0006-3223\(01\)01078-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3223(01)01078-2)
- Schwartz, T. L., Sachdeva, S., & Stahl, S. M. (2012). Glutamate neurocircuitry: Theoretical underpinnings in: Schizophrenia. *Frontiers in Pharmacology*, 3, NOV(June 2014). <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00195>
- Selten, J. P., Frissen, A., Lensvelt-Mulders, G., & Morgan, V. A. (2010). Schizophrenia and 1957 pandemic of influenza: Meta-analysis. *Schizophrenia Bulletin*, 36(2), 219–228. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbp147>
- Shu, Y. G., Yue, J. C., & Ou-Yang, Z. C. (2010). FoF1-ATPase, rotary motor and biosensor. *Nanoscale*, 2(8), 1284–1293. <https://doi.org/10.1039/b9nr00411d>
- Slifstein, M., Van De Giessen, E., Van Snellenberg, J., Thompson, J. L., Narendran, R., Gil, R., ... Abi-Dargham, A. (2015). Deficits in prefrontal cortical and extrastriatal dopamine release in schizophrenia a positron emission tomographic functional magnetic resonance imaging study. *JAMA Psychiatry*, 72(4), 316–324. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.2414>
- Sobti, M., Ishmukhametov, R., Bouwer, J. C., Ayer, A., Suarna, C., Smith, N. J., ... Stewart, A. G. (2019). Cryo-EM reveals distinct conformations of E. coli ATP synthase on exposure to ATP. *ELife*, 8, 1–16. <https://doi.org/10.7554/eLife.43864>
- Stahl, S. M. (2014). Stahl's Psychopharmacology. In *Igarss 2014*. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>
- Sulzer, D., & Zecca, L. (2009). Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: A review. *Neurotoxicity Research*, 1(3), 181–195. <https://doi.org/10.1007/bf03033289>
- Üçok, A., & Gaebel, W. (2008). Side effects of atypical antipsychotics: A brief overview. *World Psychiatry*, 7(1), 58–62. <https://doi.org/10.1002/j.2051-5545.2008.tb00154.x>
- Urban, J. (2010). *NIH Public Access*. 5(3), 379–390. <https://doi.org/10.2217/FON.09.6.Dendritic>
- Valle, A., Oliver, J., & Roca, P. (2010). Role of uncoupling proteins in cancer. *Cancers*, 2(2), 567–591. <https://doi.org/10.3390/cancers2020567>
- Van Os, J., Kenis, G., & Rutten, B. P. F. (2010). The environment and schizophrenia. *Nature*, 468(7321), 203–212. <https://doi.org/10.1038/nature09563>

- Vinogradov, A. D. (1998). Catalytic properties of the mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) and the pseudo-reversible active/inactive enzyme transition. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1364(2), 169–185. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(98\)00026-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(98)00026-7)
- Zhang, S. Y., Herman, M., Ciancanelli, M. J., Pérez de Diego, R., Sancho-Shimizu, V., Abel, L., & Casanova, J. L. (2013). TLR3 immunity to infection in mice and humans. *Current Opinion in Immunology*, 25(1), 19–33. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2012.11.001>